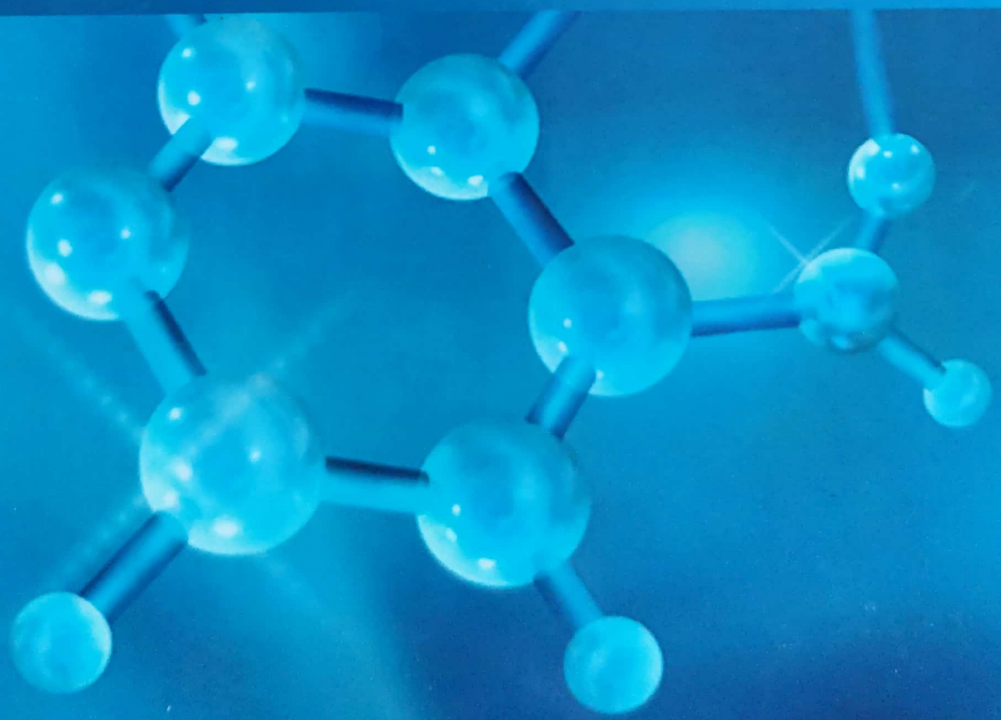
Gheorghe Chiriță Mihai Chiriță

TRATAT de BIOMOLECULE

Volumul I



Editura SEDCOM LIBRIS

TRATAT DE BIOMOLECULE

editura sed com libris

CARTEA ESTE O PASIUNE,
IAR PASIUNEA SE ÎMPARTE...

Scanned with OKEN Scanner

Editor: Petru RADU
Redactor: Alina HUCAI
Tehnoredactare şi corectură: Alina HUCAI, Alina ŢIBICHI
Concepţia şi realizarea tehnică a copertei: Iulia ANTONIADE

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României

CHIRIŢĂ, GHEORGHE

Tratat de biomolecule / Gheorghe Chiriţă, Mihai Chiriţă. – Iaşi: Sedcom Libris, 2009

2 vol.

I.S.B.N.: 978-973-670-321-8

Vol. I. – Bibliogr. – Index – I.S.B.N.: 978-973-670-322-5

I. Chiriţă, Mihai

577

Editura Sedcom Libris este acreditată de Consiliul Naţional al Cercetării Ştiinţifice din Învăţământul Superior (C.N.C.S.I.S.).

Copyright © 2009 SEDCOM LIBRIS

Toate drepturile asupra prezentei ediţii sunt rezervate Editurii Sedcom Libris, Iaşi. Reproducerea parţială sau integrală a textelor, prin orice mijloc, precum şi a graficii copertei, fără acordul scris al Editurii Sedcom Libris, este interzisă şi se va pedepsi conform legislaţiei în vigoare.

Adresa Editurii: Şos. Moara de Foc nr. 4, cod 700527, Iaşi, România
Contact Editura:
Tel.: +40.232.242.877; 234.582; 0742.76.97.72; fax: 0232.233.080
www.editurasedcomlibris.ro; e-mail: editurasedcomlibris@yahoo.com

Scanned with OKEN Scanner

Prof. univ. dr. doc. **Gheorghe Chiriță** Prof. univ. dr. **Mihai Chiriță**

TRATAT DE BIOMOLECULE

VOLUMUL I

Editura SEDCOM LIBRIS
Iași, 2009

Scanned with OKEN Scanner

Prof. univ. dr. doc. Gheorghe Chiriță, *de la Universitatea Tehnică din Iaşi a absolvit Facultatea de Chimie Industrială a Universității Tehnice din Iaşi, în anul 1951. A devenit doctor ing. în 1957 şi doctor docent în 1971. În anul 1971, a fost numit conducător ştiințific de doctorat şi sub conducerea sa, au obținut titlul de doctor 10 doctoranzi în domeniul chimiei colagenului şi a tehnologiei pieilor. La absolvirea facultății, a fost numit asistent, iar până în anul 1965, a promovat la funcția de profesor. A îndeplinit, mulți ani, funcția de şef de catedră şi a ocupat funcții administrative de prodecan şi prorector.*

A elaborat şi tipărit 9 cărți la editurile: Didactică şi Pedagogică Bucureşti, Tehnică Bucureşti, Gh. Asachi Iaşi, în domeniile: tehnologia pieilor, pielea animală, chimia colagenului.

A obținut 20 de brevete de invenție şi a publicat 160 de lucrări ştiințifice în reviste din țară şi străinătate, în domeniile menționate mai sus.

A înființat Societatea Română a Chimiştilor din Industria de Pielărie, în anul 1991, pe care a asociat-o la Uniunea Internațională a Societăților Chimiştilor din Industria de Pielărie, a cărui preşedinte onorific este pe viață.

Prof. univ. dr. Mihai Chiriță, *de la Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr.T. Popa" din Iaşi a absolvit Facultatea de Chimie Industrială a Universității Tehnice din Iaşi, în anul 1980, iar în 1993, a obținut titlul de doctor inginer. A urcat toate treptele ierarhiei universitare, fiind primul profesor de biomateriale din România, la Facultatea de Bioinginerie Medicală din Iaşi, unde este titular al disciplinelor de Biomateriale organice naturale, Fenomene de transfer în mediul biologic, Sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, Materiale şi tehnologii biomimetice şi de BIO-TRIZ. În paralel, a avut o bogată activitate în unități de producție şi de cercetare.*

Face parte din Asociația Experților din România, în specialitatea produse chimice organice. Este membru a mai multor societăți ştiințifice din țară şi din străinătate, membru în colectivul editorial al revistelor Journal of Bionic Engineering şi Romanian Dentistry Journal.

A elaborat şi tipărit 12 cărți în domeniul Bioingineriei, Biopolimerilor, Compozitelor naturale, Biomaterialelor la editurile: Tehnică Bucureşti, Gh. Asachi – Iaşi, Ştiința Chişinău, Tehnopress Iaşi, Tehnica Info Chişinău.

A elaborat, în domeniile menționate mai sus, peste 60 de lucrări ştiințifice care au fost tipărite în reviste din țară şi străinătate. Are 24 de brevete de invenție din care 12 au fost aplicate în practică şi 5 mărci de produs înregistrate.

www.biomateriale.ro

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Tratatul de Biomolecule, în două volume, este o lucrare care merită a fi abordată în continuare, pentru a se prezenta şi alte biomolecule, care sunt în atenţia cercetării ştiinţifice, pentru a se elucida aspecte de structură, de cunoaştere a unor proprietăţi, unde ingineria, bioingineria, biotehnologia, biomimetica au un câmp larg de acţiune.

Primul volum începe cu un capitol de biomimetică şi bioingineria materialelor, care se regăseşte prin multe exemplificări şi aplicaţii în aproape toate celelalte capitole ale lucrării; deoarece biomimetica este ştiinţa care investighează structurile biologice şi procesele, pentru a le folosi drept modele în dezvoltarea unor sisteme artificiale.

Descoperirile făcute în domeniul biomimeticii au un potenţial considerabil în dezvoltarea unor materiale de înaltă performanţă, cu un impact redus asupra mediului înconjurător. Termenul de biomimetică se referă la procesele, substanţele, dispozitivele, sistemele făcute de om şi care imită natura.

Numeroase structuri macromoleculare din natură constituie tot atâtea lecţii de ierarhizare structurală şi eficienţă funcţională, exemple care, cercetate astăzi, urmăresc definirea unor strategii biomimetice, pentru obţinerea de biomateriale cu aplicaţii în diferite domenii.

Biomoleculele sunt moleculele proprii materiei vii, iar cei mai mulţi compuşi chimici ai organismelor vii sunt compuşi organici ai carbonului. Compuşii organici prezenţi în materia vie se întâlnesc într-o varietate extraordinară şi mulţi dintre ei sunt extrem de complecşi. Cea mai mare parte din substanţele organice din celule sunt macromolecule ca: proteinele, acizii nucleici, polizaharidele (amidonul, celuloza etc.).

Imensa diversitate de molecule organice din organismele vii se reduce la o mare simplitate. Macromoleculele celulelor sunt compuse din molecule mici care se înşiruie într-o anumită ordine. Astfel, diferitele tipuri de proteine sunt formate din lanţuri lungi de aminoacizi aşezaţi în ordini diferite. Celuloza şi amidonul constau din lanţuri de molecule de glucoză.

Deoarece miile de macromolecule diferite prezente în celule sunt formate din numai câteva tipuri de molecule simple, care au rolul de unităţi

Scanned with OKEN Scanner

constituente, se poate afirma că există o mare simplitate în organizarea moleculară a celulelor.

Biomoleculele, bine definite din punctul de vedere al structurii şi proprietăţilor lor, sunt produse de selecţie în timpul evoluţiei terestre, fiind probabil moleculele cele mai potrivite funcţiei lor biologice şi reacţionează unele cu altele în moduri specifice. Mărimea şi forma lor determină specificitatea interacţiilor biologice, ca şi ultra structura celulelor vii.

În volumul I, într-un capitol, se fac o serie de consideraţii despre apă, care este la originea vieţii şi este indispensabilă supravieţuirii a tot ce este viu, apoi, în capitolele următoare se tratează zaharurile, lipidele, enzimele, acizii nuclei – ci, aminoacizii, peptidele şi proteinele, insistându-se, mai ales asupra unor aspecte despre acizii nucleici, aminoacizi, peptide şi proteine.

În volumul al II-lea, se abordează domeniul larg al principalelor proteine fibroase, cu multe implicaţii în biologie, biochimie, bioinginerie: colagenul, elastina, reticulana, keratina, ca şi despre mătasea de păianjen, mult cercetată de colective din USA, Germania şi Canada şi mătasea de viermi de mătase.

Sunt prezentate problemele de structură, proprietăţi şi aplicaţii pentru biomateriale, biosinteze şi sinteze.

Sunt expuse date care pot sugera direcţii de cercetare în scopul dezvoltării cunoaşterii şi a unor aplicaţii practice pe bază de biomimetică, nanotehnologii, bioinginerii, pentru realizarea unor biomateriale utilizabile în diverse scopuri şi cu precădere în medicină.

Tratatul de Biomolecule se adresează studenţilor, cercetătorilor, specialiştilor din domeniul biochimiei, biologiei, bioingineriei, a celor ce au preocupări în promovarea biomaterialelor.

Având în vedere problemele actuale şi multiple de care se ocupă această lucrare, autorii vor fi recunoscători celor care se vor face sugestii cu privire la conţinutul acestui tratat.

1 octombrie 2009

Autorii

Scanned with OKEN Scanner

Cuprinsul volumului I

Partea I

Biomimetica şi Bioingineria materialelor

Cap. 1. Biomimetica şi bioingineria materialelor

Partea a II-a

Componente ale lumii vii

Cap. 2. Biomolecule, celule, ţesuturi
Cap. 3. Apa
Cap. 4. Zaharuri
Cap. 5. Lipide
Cap. 6. Enzime
Cap. 7. Acizi nucleici
Cap. 8. Aminoacizi
Cap. 9. Peptide
Cap. 10. Biosinteza proteinelor
Cap. 11. Proteine

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINSUL

Volumul I

PARTEA I

BIOMIMETICA ŞI BIOINGINERIA MATERIALELOR

1. BIOMIMETICA ŞI BIOINGINERIA MATERIALELOR

1.1. Simbioze spre viață 1
1.2. De ce să imităm natura ? 2
1.3. Biomimetica 5
1.4. Istoria materialelor 9
1.5. Materiale şi structuri biomimetice 12
1.6. Aplicații biomimetice în medicină 22

Bibliografie *50*

PARTEA a II-a

COMPONENTE ALE LUMII VII

2. BIOMOLECULE, CELULA, ȚESUTURI

2.1. Biomolecule 67
2.2. Celula 71
2.2.1. Considerații generale 71
2.2.2. Celulele procariote 73
2.2.3. Celulele eucariote 76
2.2.3.1. Caracteristici generale 76

Scanned with OKEN Scanner

2.2.3.2. Membrana celulară 78
2.2.3.3. Nucleul 80
2.2.3.4. Citoplasma 84
2.2.3.5. Ciclul celular, proliferarea şi creşterea celulelor 94
2.2.3.6. Consideraţii generale privind îmbătrânirea 97
2.3. Ţesuturile 98
2.3.1. Ţesuturile epiteliale 100
2.3.2. Ţesuturile conjunctive 109
2.3.3. Ţesutul muscular 116
2.3.4. Ţesutul nervos 117
2.3.5.Ţesutul sanguin şi limfatic 117

Bibliografie *117*

3. APA

3.1. Consideraţii generale 120
3.2. Proprietăţile fizice ale apei 123
3.3. Structura apei şi a gheţii 125
3.4. Apa grea 131
3.5. Soluţiile în apă 132
3.5.1. Aciditatea şi alcalinitatea soluţiilor 134
3.6. Apa ca solvent 139

Bibliografie *142*

4. ZAHARURI

4.1. Introducere 143
4.2. Monozaharide 144
4.2.1. Proprietăţile fizice şi chimice ale monozaharidelor 149
4.2.2. Monozaharide mai importante 151
4.3. Oligozaharide 152
4.4. Polizaharide 155
4.4.1. Polizaharide de rezervă 156
4.4.2. Polizaharide de structură 159
4.5. Glicoproteide 163
4.5.1. Mucopolizaharide 166

Scanned with OKEN Scanner

4.5.1.1. Acidul hialuronic 166
4.5.1.2. Condroitina, Condroitin 4 sulfatul, Condroitin 6 sulfatul 167
4.5.1.3. Sulfatul de dermatan 168
4.5.1.4. Heparina, Sulfatul de heparină 169
4.5.1.5. Sulfatul de keratan 170
4.5.1.6. Hidratarea mucopolizaharidelor 170

Bibliografie *173*

5. LIPIDE

5.1. Introducere 174
5.2. Lipidele complexe 175
5.2.1. Gliceridele 175
5.2.1.1. Proprietăţile fizice şi chimice ale gliceridelor 177
5.2.2. Acizii graşi 179
5.2.3. Alchileteracilglicerolii 181
5.2.4. Glicozilacilglicerolii 182
5.2.5. Fosfogliceridele 182
5.2.6. Sfingolipidele 185
5.2.6.1. Sfingomielinele 186
5.2.6.2. Glicosfingolipidele neutre 186
5.2.6.3. Glicosfingolipidele acide 187
5.2.7. Cerurile 188
5.3. Lipidele simple 189
5.3.1. Terpenele 189
5.3.2. Steroidele 191
5.3.3. Prostaglandinele 195

Bibliografie *196*

6. ENZIME

6.1. Caracteristici generale 198
6.2. Activitatea catalitică a enzimelor 201
6.3. Cinetica reacţiilor catalizate enzimatic 204
6.3.1. Efectul concentraţiei de substrat

Scanned with OKEN Scanner

asupra activității enzimatice 206
6.3.2. Efectul temperaturii asupra activității enzimatice 208
6.3.3. Efectul pH-ului asupra activității enzimatice 209
6.3.4. Influența activatorilor și a inhibitorilor asupra activității enzimatice 209
6.4. Specificitatea catalizei enzimatice 212
6.5. Enzime proteolitice 213
6.5.1. Enzime proteolitice ale vertebratelor 214
6.5.2. Enzime proteolitice ale sângelui 220
6.5.3. Enzime proteolitice de origine vegetală 221
6.5.4. Enzime proteolitice microbiene și fungice 222

Bibliografie *224*

7. ACIZII NUCLEICI

7.1. Noțiuni generale 226
7.2. Pirimidine și purine 227
7.2.1. Pirimidina 227
7.2.2. Purina 229
7.3. Nucleozide 231
7.4. Nucleotide 232
7.5. Acidul dezoxiribonucleic (ADN) 234
7.5.1. ADN viral 242
7.5.2. ADN bacterian 242
7.5.3. Cromozomii eucariotelor 242
7.5.4. Rolul genetic al ADN 245
7.5.5. Proprietățile ADN în soluție 247
7.6. Acidul ribonucleic (ARN) 249
7.6.1. Acidul ribonucleic mesager (ARNm) 250
7.6.2. Acidul ribonucleic de transfer (ARNt) 252
7.6.3. Acidul ribonucleic ribozomal (ARNr) 254
7.6.4. Ribozomii 255
7.6.5. Virusurile 255
7.7. Acțiunea și interacțiunea genelor 257
7.7.1. Reglarea activității genelor 262
7.8. Măsurarea concentrației și purității acizilor nucleici 266
7.8.1. Metode optice 266
7.8.2. Metoda fluorescenței 266

Scanned with OKEN Scanner

7.9. Păstrarea ADN 267
7.10. Purificarea ADN 267
7.11. Precipitarea ADN 268
7.12. Izolarea ADN din *Escherichia coli* 268
7.13. Izolarea plasmid ADN 269

Bibliografie ***271***

8. AMINOACIZII

8.1. Considerații generale 273
8.2. Proprietățile fizice ale aminoacizilor 284
8.3. Proprietățile chimice ale aminoacizilor 295
8.4. Stereochimia aminoacizilor 300
8.4.1. Configurația aminoacizilor 302
8.5. Biochimia aminoacizilor 309
8.5.1. Aminoacizii în alimentație 309
8.5.2. Degradarea oxidativă a minoacizilor 311
8.5.3. Decarboxilarea aminoacizilor de către microorganisme 319
8.5.4. Transaminarea 322
8.6. Aminoacizi mai importanți și derivații lor 324
8.7. Sinteze de aminoacizi 329

Bibliografie ***336***

9. PEPTIDE

9.1. Caracteristici generale 337
9.2. Sinteza peptidelor 341
9.2.1. Sinteza peptidelor pe suport polimer 348
9.3. Peptide naturale biologic active 350

Bibliografie ***352***

10. BIOSINTEZA PROTEINELOR

10.1. Traducerea mesajului genetic la biosinteza proteinelor 353
10.2. Inhibitori ai biosintezei proteice 358

Scanned with OKEN Scanner

10.3. Poliribozomii 360
10.4. Mitocondriile 362
10.5. Codificarea informației genetice 363
10.5.1. Originea și evoluția codului genetic 366
10.6. Purificarea proteinelor 369

Bibliografie ***372***

11. PROTEINE

11.1. Considerații generale 374
11.2. Fundamentul structurii proteinelor 380
11.3. Structura proteinelor 385
11.4. Funcțiile biologice ale proteinelor 393
11.5. Denaturarea proteinelor 394
11.6. Stabilitatea și funcțiile proteinelor 395
11.7. Proteine mai importante 398
11.7.1. Proteine solubile 398
11.7.2. Proteine insolubile 402
11.7.3. Proteide 404
11.8. Separarea, purificarea și caracterizarea proteinelor 407
11.8.1. Considerații generale 407
11.8.2. Separarea proteinelor din amestecuri 410
11.8.3. Extracția și purificarea proteinelor 413
11.8.4. Caracterizarea moleculelor de proteine 413

Bibliografie ***413***

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA I

BIOMIMETICA ŞI BIOINGINERIA MATERIALELOR

Scanned with OKEN Scanner

Biomimetica urmăreşte realizarea modelelor, a sistemelor, imitând invenţiile vieţii. Sunt implicate domenii noi ale cunoaşterii, ştiinţa materialelor şi biotehnologiile.

Vieţuitoarele, în competiţia lor eternă pentru supravieţuire, au găsit căile de adaptare, reproducere şi de evoluţie, folosind un număr restrâns de resurse.

Toate organismele vii consumă, energie într-o formă sau alta, încearcă continuu să facă un efort maxim cu un consum minim de energie şi optimizează constant relaţia energie–funcţie vitală. Organismele care predomină sau care evoluează rapid sunt acele care pot asimila aproape toată hrana ingerată sau care s-au adaptat eficient în a absorbi şi a transforma forme de energie din mediul ambiental.

Pentru organismele vii, costul este echivalent energiei, iar competiţia de pe piaţă se echivalează cu lupta pentru supravieţuire, unde cel mai eficient energetic evoluează, se reproduce şi, deci, supravieţuieşte.

Ingineria este limitată de costuri, şi va supravieţui acea tehnologie sau aplicaţie care dă un randament maxim la un preţ de cost minim.

„Copierea" unor idei de la natură sau interpretarea şi implementarea lor adecvată pot creşte eficienţa utilizării energiei în multe dintre procesele inginereşti. Problema bioinginerilor, a inginerilor şi a biologilor este mereu aceeaşi: preţul de cost, adică designul, fabricarea, întreţinerea şi reciclarea noilor produse.

Lumea biologică este conservatoare sub aspectul componentelor utilizate, dar extrem de subtilă în abilitatea de aranjare structurală, în ierarhizarea acestora.

Materialele biologice probează performanţe specifice şi caracteristici remarcabile, dobândite nu prin utilizarea unor materiale performante, ci prin specificul construcţiei şi al designului structurilor.

Procesele de creştere a sistemelor organice dau naştere la sisteme compozite sintetice complexe moi sau dure. La scară microscopică, aceste materiale sunt constituite din compozite cu matrici fibrilare.

Pe tot parcursul acestei lucrări şi, mai ales, în partea a III-a, care tratează despre proteinele fibroase (colagenul, elastina, keratina, mătasea de păianjen etc), s-au inclus bazele mimeticii, a biotehnologiilor în exemplele de aplicaţii practice ale biomaterialelor.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

BIOMIMETICA ŞI BIOINGINERIA MATERIALELOR

1.1. Simbioze spre viaţă 1
1.2. De ce să imităm natura? 2
1.3. Biomimetica 5
1.4. Istoria materialelor 9
1.5. Materiale şi structuri biomimetice 12
1.6. Aplicaţii ale biomimeticii 22

Bibliografie *50*

1.1. SIMBIOZE SPRE VIAŢĂ

Cercetarea ştiinţifică în domenii biomedicale vizează realizarea modelelor şi dispozitivelor, imitând sau inspirându-se din „invenţiile" vieţii. Unele dintre aceste invenţii servesc ca proteze sau aparate de schimb (rinichi artificiali, audiofoane, dializoare).

În acest domeniu extrem de actual, găsim implicate laturi noi ale cunoaşterii, ca ştiinţa biomaterialelor şi bioingineria medicală. Creşterea exponenţială a interesului pentru acest domeniu de cercetare cu aplicaţii medicale este confirmată prin 111 822 de publicaţii despre materiale biologice şi a 2 553 de publicaţii despre compozite biologice, între anii 2000 – 2005, însumând acelaşi număr de semnalări pe această temă în perioada 1950 – 1999.

Apare dictonul: *Viitorul medicinii = biomateriale* [1]. Se intră astfel în era biomaterialelor şi a compozitelor de uz medical, cu topici precum: implanturi ortopedice, materiale regenerative, stenturi cardiovasculare, valve

cardiace, pacemakers, substituţie tisulară, nanoroboţi medicali [2, 3], biomembrane, biosenzori, nanotehnologii medicale, nanomedicină etc.

Simbioza dintre termenii natură (plante şi animale) şi inginerie sau bioinginerie este extrem de interesantă şi cu multe aplicaţii practice (Fig. 1.1.).

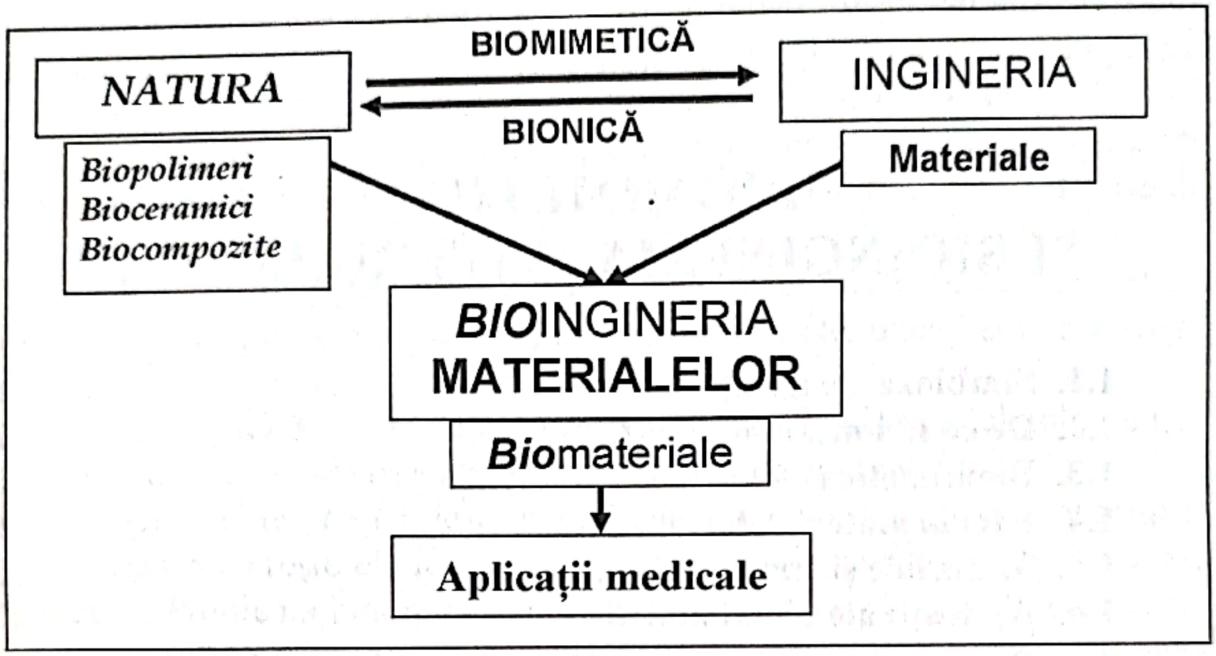


Fig. 1.1. Simbioze spre viaţă (4)

1.2. DE CE SĂ IMITĂM NATURA?

Vieţuitoarele, în competiţia lor eternă pentru supravieţuire, au găsit căile de adaptare, reproducere şi evoluţie, folosind un număr restrâns de resurse.

Toate organismele vii consumă energie într-o formă sau alta (exemplu, lumină solară sau alte organisme drept hrană), încearcă în permanenţă să facă un efort maxim, cu o cheltuială minimă de energie şi optimizează constant relaţia energie – funcţie vitală. Organismele care predomină sau care evoluează rapid sunt acelea care pot asimila aproape total hrana ingerată sau care s-au adaptat eficient în a absorbi şi a transforma forme de energie din mediul ambiental.

Pentru organismele vii, costul este echivalent energiei, iar competiţia pe piaţă se echivalează cu lupta pentru supravieţuire, unde cel mai eficient energetic evoluează, se reproduce şi, deci, supravieţuieşte.

Prin comparaţie, ingineria este limitată de costuri, supravieţuind acea tehnologie sau aplicaţie care dă randament maxim, la un preţ de cost minim.

Scanned with OKEN Scanner

„Copierea" unor idei de la natură sau interpretarea şi implementarea lor adecvată pot creşte eficienţa utilizării energiei în multe dintre procesele inginereşti. Problema bioinginerilor, a inginerilor şi a biologilor este mereu aceeaşi: preţul de cost, şi anume cât costă designul, fabricarea, întreţinerea şi reciclarea noilor produse.

În natură, forma sau structura este mai „ieftină" decât componentele acesteia (de exemplu: zaharuri, aminoacizi, săruri etc.), întrucât atât organismele vegetale, cât şi cele animale trebuie să şi le prepare din hrana provenită din mediul înconjurător.

Controlul formelor vii asupra asamblării şi a structurării acestor materii prime esenţiale este mult mai eficient şi deci, mai performant, decât cel al proceselor inginereşti. Latura primordială a acestui control o constituie mecanismele feed-back-ului celular care direcţionează acumularea materialelor spre locurile unde sunt stringent necesare, rezultând, astfel, structuralizări adaptative.

Lumea biologică este conservatoare sub aspectul componentelor utilizate, dar extrem de subtilă în abilitatea de aranjare structurală, în ierarhizarea acestora.

Materialele biologice probează performanţe specifice şi caracteristici remarcabile, dobândite nu prin utilizarea unor materiale performante, ci prin specificul construcţiei şi al designului structurilor.

Structurile ierarhizate sunt ansambluri de unităţi micro- şi macro-moleculare sau agregate ale acestora, care sunt învăluite sau interţesute cu alte faze organizate similar. Arhitecturile naturale multistratificate conferă ansamblului caracteristici unice. Arhitecturile ierarhizate ale celulozei din lemn sau a colagenelor din cartilaj constituie exemple definitorii de materiale compozite naturale (biocompozite), desemnate să joace roluri vitale esenţiale în aplicaţii multifuncţionale.

Astfel, procesele de creştere a sistemelor organice dau naştere la sisteme compozite complexe moi sau dure. La scară macroscopică, aceste materiale sunt constituite din compozite cu matrici fibrilare.

Ţesuturile moi sunt constituite dintr-o reţea din colagen şi elastină învăluită de matricea extracelulară. *Colagenul* este o proteină fibroasă formată din macromolecule rigide de tropocolagen (vezi cap. 11) [7].

Un alt exemplu de înaltă structurare – ierarhizare naturală îl constituie dubla elice a ADN din fiecare celulă umană (vezi cap. 7). *Informaţia genetică* este conţinută în nucleul celulelor, în *cromozomi*, în segmente numite *gene*. Omul posedă cca 30 000 de gene, cu foarte puţine mai mult raportat la diferenţa de complexitate, faţă de numărul de gene al unor plante unicelulare de cca 25 000 de gene. Natura se dovedeşte, din nou, conservatoare, iar oa-

Scanned with OKEN Scanner

menii de ştiinţă trebuie să caute în altă parte explicaţia complexităţii organismului uman.

Abundenţa din natură în structuri complexe macromoleculare şi supramoleculare oferă cercetătorilor adevărate lecţii de structuralizare ierarhizată şi de eficienţă funcţională.

Compozitele naturale sunt constituite din materiale individual slabe, flexibile, nerezistente la factori mecanici, uşor termo-oxidabile, pe care, însă, natura are capacitatea de a le combina şi organiza în structuri rezistente, tari, rigide sau elastice, dure, uşoare şi rezistente la acţiunea agenţilor chimici.

Biosinteza materialelor biologice se realizează în urma unor procese energetice extrem de eficiente. Cantitatea mică de energie consumată de aceste procese este răsplătită de un design molecular precis al constituenţilor biopolimerici, auto-asamblaţi în structuri precis ierarhizate.

Aceste structuri naturale se caracterizează prin: abilitatea de a suporta sarcini mari, multiple şi complexe, capacitatea de autoreparare şi autoîntreţinere, densitate mică şi probează eficienţă maximă în aranjarea spaţială a componentelor structurale proprii.

Materialele compozite organice naturale sunt compozite biologice. Acestea sunt sintetizate de sistemele biologice, în condiţii de temperatură şi presiune ambientale, în mediu apos şi ating un grad extrem de ridicat de complexitate fizico-chimică şi funcţională. Biocompozite ca osul, lemnul sau cuticula insectelor oferă o sursă bogată de informaţii sau soluţii în probleme de design a materialelor create de către om, atât la nivel microstructural, cât şi la nivel macroscopic.

Compoziţia chimică, reactivitatea *in vivo* a componentelor, forma, dimensiunile, orientările angulare şi organizarea pe ansamblu a materialelor compozite naturale pot sugera noi concepte de materiale compozite sintetice sau hibrid, natural-sintetice.

Datorită designului lor inteligent şi proprietăţilor fizico-chimice complexe, materialele naturale intră în componenţa majorităţii compozitelor realizate de către om.

Exemplele clasice de compozite naturale de înaltă performanţă sunt cele în care matricea de proteine controlează formarea componentelor anorganice, inclusiv a carcaselor de os şi de email. Alte compozite naturale cu proprietăţi unice sunt spinii cactusului, cu gradul lor ridicat de rigiditate, datorită unui compozit celulozic-arabinic, tunicile piersicilor de mare, compozite pe bază de celuloză, proteine şi mucopolizaharide etc.

Scanned with OKEN Scanner

1.3. BIOMIMETICA

Biomimetica (biomimeză, biognoză, bionică) reprezintă beneficiul tehnologic obţinut prin actul de a „împrumuta" sau de a „fura" idei de la natură.

Datorită faptului că mulţi cercetători şi tehnologi caută să afle răspunsurile la enigmele corpurilor animalelor şi plantelor, pentru a se putea inspira în creaţie, să realizeze noi materiale şi structuri, a apărut disciplina de *biomimetică*. Astfel, unii studiază căile metabolice de formare a compuşilor chimici naturali, pentru a putea crea o legătură între o următoare invenţie şi originea acesteia. Alţi cercetători imită porozitatea oaselor, adezivii moluştelor etc.

Studiile biomimetice au menirea de a clarifica de ce performanţele materialelor naturale sunt semnificativ superioare acelora făcute de mâna omului (compozitele sintetice) sau care dintre componentele naturale sunt responsabile de anumite proprietăţi sau caracteristici.

Biomimetica este o ştiinţă care investighează structurile biologice şi procesele, pentru a le folosi drept modele în dezvoltarea unor sisteme artificiale. Descoperirile făcute în domeniul biomimeticii au un potenţial considerabil în dezvoltarea unor materiale de înaltă performanţă, cu un impact redus asupra mediului înconjurător [8, 9].

Aceasta este graniţa dintre vechi şi nou, punctul de plecare în dezvoltarea unor ramuri noi ale cunoaşterii aplicate. Domeniul materialelor biologice şi al sistemelor naturale este extensiv, reprezentând o temă interdisciplinară care cuprinde ştiinţa biomaterialelor, biomecanica (10), bioingineria, ingineria cu aportul biologiei şi al medicinii.

Termenul de *biomimetic* se referă la procesele, substanţele, dispozitivele, sistemele făcute de către om şi care imită natura.

Arta şi ştiinţa de a desena, proiecta şi construi aparate biomimetice se numeşte *biomimetică* şi însumează mai multe sfere de interes ştiinţific şi aplicativ, dintre care: nanotehnologii, protezare medico-chirurgicală şi industrie medicală (anticorpi şi substituenţi universali de sânge nanorobotici, organe artificiale, membre artificiale, diverse dispozitive electronice etc.), robotică, inteligenţă artificială, industrie de apărare (aparate de vizionare în diverse lungimi de undă, aparate de ascultat, amplificatoare de semnal, sisteme de navigare, convertoare de date) etc.

J. Vincent [11, 12] a subliniat faptul că designul naturii are multe aplicaţii practice în diverse sectoare ale activităţii umane. Velcro şi turnul Eiffel nu au nimic în comun, în afară de faptul că designerii ambelor s-au inspirat din natură, aplicând principii biomimetice. Reţeaua neuronală reprezintă un

Scanned with OKEN Scanner

computer biomimetic ipotetic care funcţionează prin asocieri şi prezumţii în urma unei instruiri prealabile şi care poate învăţa din propriile greşeli. Pe parcursul existenţei lor, atât plantele, cât şi animalele au evoluat, adică au supravieţuit, soluţionând probleme pe care, astăzi, cu alte mijloace, încearcă să le rezolve oamenii de ştiinţă. Plantele şi animalele au dat soluţii optime de design la probleme existenţiale.

Numeroasele structuri macromoleculare şi supramoleculare din natură constituie tot atâtea lecţii de ierarhie structurală şi eficienţă funcţională, exemple care sunt cercetate astăzi spre definirea unor noi strategii biomimetice pentru obţinerea de biomateriale cu aplicaţii medicale.

Legăturile chimiei cu ştiinţele vieţii (biologie, medicină, ştiinţe agricole şi cele derivate din acestea) sunt vechi şi bine cunoscute. Încă de la începutul secolului al XX-lea, mari chimişti organicieni au fost preocupaţi de aspectele biologice ale chimiei, iar numeroase exemple reprezentative în acest sens se găsesc în seria Premiilor Nobel legate de chimia naturii (Fig. 1.2.).

În 1907, laureatul Nobel, Emil Fischer, scria: *„în prima sa tinereţe, chimia organică a fost strâns conectată cu biologia"*.

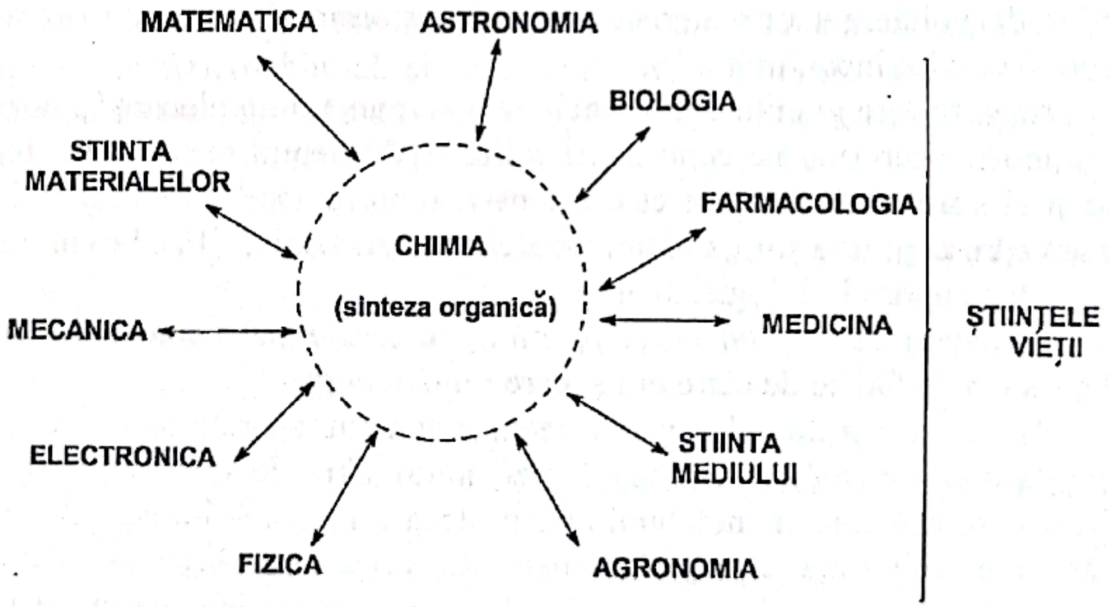


Fig. 1.2. Legături de interdisciplinaritate

Elaborarea modelului structurii de dublă elice a acidului dezoxiribonucleic (ADN), de către biologii Francis Crick şi James Watson, a condus la acordarea, în anul 1962, a Premiului Nobel pentru medicină.

Scanned with OKEN Scanner

Un număr mare de cercetări au abordat studiul catalizatorilor naturali cu structură proteică, enzimele, care, în condiţii blânde de reacţie, pot creşte extrem de selectiv viteza unei reacţii de cca 10 miliarde de ori, reducând, de exemplu, la 5 secunde, durata unei reacţii care, necatalizată, ar dura 1 500 de ani. Se încearcă imitarea naturii şi în acest domeniu, dorindu-se obţinerea de enzime artificiale prin utilizarea aceloraşi fragmente moleculare pe care le foloseşte natura. Se dezvoltă rapid domeniul *chimiei biomimetice*, dedicat imitării chimiei enzimelor naturale cu mijloacele şi materialele clasice în paralel cu domeniul *reacţiilor catalizate de enzime naturale* extrase din medii vii (vezi cap. 6).

Laureatul Nobel J. M. Lehn sublinia: *„chimia se bazează pe lumea biologică printr-o axiomă de existenţă: simplul fapt că sistemele biologice şi, în particular, fiinţele umane există, demonstrează complexitatea fantastică a structurii şi funcţionării lumii moleculare. Ea arată că o astfel de complexitate există, în pofida inabilităţii noastre prezente de a înţelege cum operează şi cum a apărut.“*

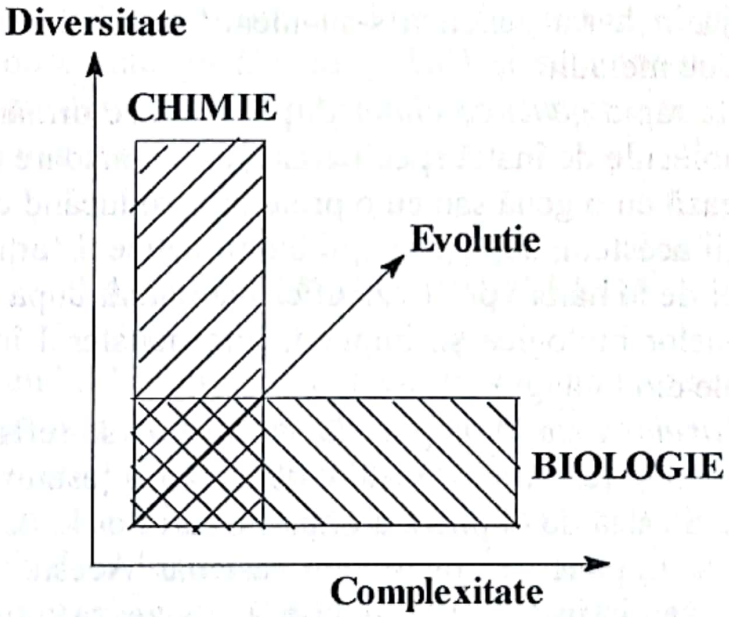


Fig. 1.3. Corelaţia dintre chimie şi biologie

Lehn a prezentat, într-o diagramă, corelaţia dintre biologie (Fig. 1.3) – care operează cu un număr redus de clase chimice, dar de complexităţi extreme – şi chimie – care lucrează cu structuri mult mai simple, dar răspândite în numeroase grupe structurale.

Scanned with OKEN Scanner

Mimând şi adaptând conceptele naturale, se pot crea noi clase de biomateriale cu proprietăţi inedite, cum ar fi recunoaşterea moleculară, autoasamblarea şi autorepararea. Prin înţelegerea precisă a secretelor naturii privind interacţiunile ce guvernează matricea celulară, se pot imagina şi proiecta noi biomateriale biomimetice, cu facilitarea adeziunilor celulare specifice sau cu acţiune inversă, de diminuare a adsorbţiei de proteine nespecifice, ca în cazul acoperirilor anticoagulante.

Disciplina ştiinţifică preocupată de studiul genelor a primit numele de *genomică*. Lansat în 1990, proiectul *genomului uman*, incluzând laboratoare din mai multe ţări, cu un total de circa 1 000 de cercetători, elucida, în anul 2000, peste 95 % din secvenţa ADN. Prin cumularea informaţiilor furnizate de un număr imens de determinări, a fost posibilă asamblarea aşa-numitei *hărţi genetice* a omului.

Proteomica studiază replicarea, transcripţia şi translaţia, etapele cheie ale biosintezei proteice, specifice fiecărui organism în parte. Implicaţii practice ale *genomicii* încep deja să apară în medicină. Se prevăd *terapii genetice* care nu sunt adresate bolii, cum este cazul medicinii clasice, ci pacientului. Deja în harta genetică s-au identificat şi marcat multe dintre genele care produc maladii.

Se dezvoltă rapid *genetica chimică*, prin care se urmăreşte sinteza organică a unor molecule de înaltă specificitate, asemănătoare cu cele naturale şi care reacţionează cu o genă sau cu o proteină, producând creşterea sau inhibarea activităţii acesteia, după principii biomimetice. Efortul chimiştilor de a împrumuta idei de la natură probează eficienţă numai după înţelegerea profundă a fenomenelor biologice şi, implicit, prin transferul în chimie a unor concepte esenţiale din biologie.

Ingineria tisulară sau *bioingineria ţesuturilor* se referă la metode de cultivare a celulelor şi ţesuturilor, menite de a realiza ţesuturi viabile utile în medicină, indicând calea de obţinere a organelor artificiale de înlocuire: piele, cartilaj, rinichi, ficat, pancreas, os, sistem vascular. Aceste ţesuturi vii, produse în laborator sau în instalaţii bioindustriale, vizează substituţia ţesutului bolnav sau / şi stimularea – dezvoltarea unui nou ţesut la locul lezat. Cea mai veche referinţă la principiile ingineriei tisulare de astăzi [11] poate fi considerată pasajul din *Geneza I:1*: „Dumnezeu a suflat un somn adânc către bărbat şi i-a luat una din coaste, şi a închis locul la loc cu carne. Dumnezeu apoi a construit coasta femeii din coasta pe care i-o luase din bărbat".

Ingineria genetică, care manipulează mesajul genetic, este domeniul cel mai spectaculos din toate aplicaţiile existente, fiind echivalentul chirurgiei la nivel intracelular.

Scanned with OKEN Scanner

Ingineria enzimatică studiază realizarea şi conducerea bioreactoarelor, unde enzimele au rolul principal în biocataliză. Şi exemplele de ramuri noi ale cunoaşterii pot continua.

Biomimetica a fost recunoscută ca ştiinţă abia în anul 1917, de către D'Arcy Thompson, un naturalist şi matematician scoţian care a aplicat matematica şi fizica în morfologie şi a comparat scheletul animalelor cu patru membre cu realizarea podurilor, concluzionând că podurile nu sunt altceva decât „schelete bine plănuite". A fost primul om de ştiinţă care a integrat fizica şi matematica în zoologie şi morfologie.

Bionica reprezintă ştiinţa ce studiază sistemele biologice pentru a obţine cunoştinţe utile fiinţei umane. Din punct de vedere etimologic, cuvântul vine de la grecescul *bio* ce înseamnă „viaţa" şi de la *nica*, despre care nu se cunoaşte cu precizie dacă se referă la ultimele patru litere din cuvintele *tehnică* sau *electronică*.

Anul de naştere al bionicii este 1960. Bionica îşi asumă responsabilitatea istorică de a înnoi produsele sale, prin învăţătura pe care noi, oamenii, o obţinem prin observarea naturii; fără îndoială, cea mai mare provocare este folosirea acestor noţiuni în producerea analogilor cotidieni cu caracteristicile observate. Încălzirea globală şi schimbarea nedorită a mediului de viaţă au dus la conştientizarea importanţei biomimeticii pentru a menţine ce ne-a mai rămas de la natură.

1.4. ISTORIA MATERIALELOR

Dacă privim îndărăt în istoria omenirii, vom constata că epocile poartă numele celor mai importante materiale ale vremii: epoca de piatră, epoca bronzului, epoca fierului, epoca oţelului, a polimerilor etc. (Fig. 1.4.).

Omul primitiv a folosit materiale ca piatra şlefuită în diverse forme, lemnul, oase de la diferite animale pentru unelte, arme şi podoabe. Lemnul a fost materialul de bază în construcţia ambarcaţiunilor, a instrumentelor muzicale, a multor ansamble şi subansamble ale maşinilor manufacturilor, iar mai târziu, din lemn au fost construite şi aparatele de zbor. Criteriile de alegere a acestor materiale naturale au fost, mai ales, disponibilitatea şi proprietăţile lor mecanice.

Fiecare nouă epocă a reprezentat un pas înainte în civilizaţie şi cultură. Dezvoltarea ştiinţei materialelor a determinat soarta şi progresul omenirii odată cu dezvoltarea primelor unelte, făcute din lemn şi piatră. Cele mai avansate materiale ale timpului au conferit avantaje capitale care au de-

Scanned with OKEN Scanner

partajat popoare şi civilizaţii. Lipsa unui material a stârnit nevoia spre migraţie sau de cucerire de noi teritorii.

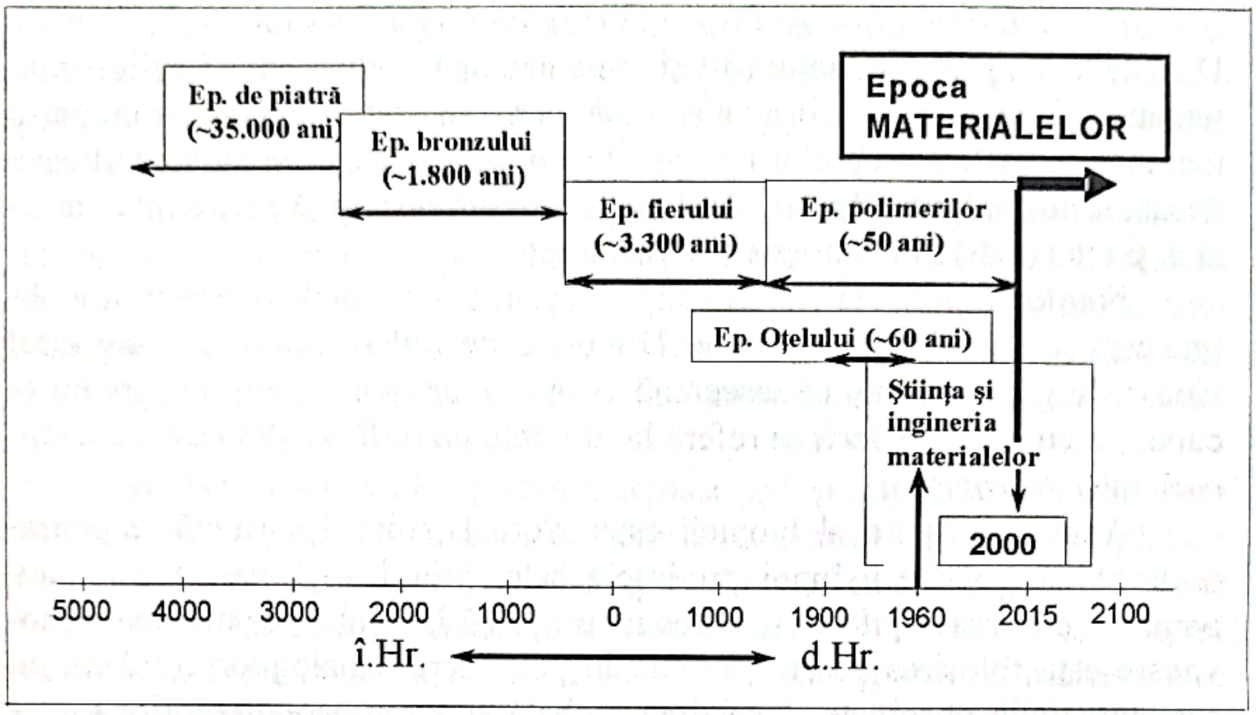


Fig. 1.4. Ilustrare cronologică a istoriei materialelor

Atunci când materialele biologice nu au mai întrunit criteriile de selecţie (ca dimensiune sau ca formă, stabilitate la temperatură, biodegradare sau putrezire), omul a căutat să producă materiale noi, spre a-şi îndeplini necesităţile. Astfel, au apărut materialele ceramice care se întăresc prin ardere în foc şi apoi metalele, cu utilizări dintre cele mai diverse, după descoperirea cărbunelui şi a tehnologiilor de prelucrare.

Se poate afirma că istoria omenirii a fost şi va fi dictată de tehnologia materialelor care permit, la rândul lor, avansarea în cunoaştere, în noi tehnologii, dispozitive şi aparate, cu influenţă marcantă în tot ceea ce însemna viaţă pe Terra. Prin noile tehnologii, se „nasc" categorii de produse cu o valoare adăugată mare, aplicate în domenii de vârf: medicină, apărare, domeniul aerospaţial, performanţă umană, sport etc.

Caracteristicile unui material exprimă acele manifestări calitative ale sale, în virtutea cărora el poate fi identificat şi i se pot găsi aplicaţii specifice.

Proiectarea, realizarea, utilizarea şi întreţinerea unui sistem funcţional depind, în primul rând, de caracteristicile materialelor din care este alcătuit.

Proprietăţile materialelor sunt expresia cantitativă a caracteristicilor acestora. Orice material poate fi caracterizat prin trei grupuri de atribute:

Scanned with OKEN Scanner

a. atribute compoziţionale – definite prin compoziţia chimică, cu implicaţii în stabilitatea în timp şi faţă de condiţiile de mediu ori de anturaj chimic;

b. atribute structurale – dictate de morfologia locală sau / şi de ansamblu a materialului; reprezintă baza majorităţii caracteristicilor şi proprietăţilor unui material;

c. atribute funcţionale – îşi au originea în primele două, adăugând acele particularităţi care conferă materialului proprietăţile de întrebuinţare, permit interfaţarea cu alte materiale şi preluarea unor funcţii în sistemele funcţionale.

Inovaţiile în chimia polimerilor au lansat o eră nouă, în rapidă şi plină schimbare a tehnologiei materialelor.

Materialele compozite, printre care sticla, fibra de carbon şi structurile de Kevlar (vezi cap. 15), încorporate în matrici polimere, sunt astăzi răspândite pe scară largă, cu aplicaţii dintre cele mai variate.

Progresele recente ale ştiinţei materialelor, ale biologiei moleculare şi ale posibilităţilor de caracterizare la scară nanometrică, au asigurat baza ştiinţifică pentru ingineria structurilor macromoleculare privind nu doar aspecte compoziţionale, dar şi elaborarea de materiale structural ierarhizate, cu proprietăţi supramoleculare specifice.

Intră în scenă *chimia supramoleculară*, dezvoltată, în special, de D. J. Cram, C. J. Pedersen şi J. M. Lehn şi caracterizată lapidar drept chimia ansamblurilor moleculare şi a legăturilor intermoleculare.

Chimia supramoleculară vizează transformarea chimiei într-o *ştiinţă a materiei informatizate*.

Similar informaţiei biologice codificate în ADN, informaţia chimică este moleculară şi codificată în componentele moleculei, în atomi. Această informaţie dictează mecanisme precise la nivel supramolecular, folosind căi similare lumii vii: *recunoaşterea, auto–organizarea moleculară, auto–asamblarea moleculară, auto–replicarea.*

Toate acestea conduc la construirea *unor piese şi maşini moleculare*, organizate în măsură să recepteze şi să proceseze informaţii analog sistemelor naturale.

Cu respectul scării dimensionale nanometrice la care au loc aceste interacţiuni, chimia supramoleculară este strâns legată de domeniul *nanochimiei* şi al *nanomaterialelor*.

În anul 1999, Laureatul Nobel Richard Smalley afirma: *„impactul nanotehnologiilor asupra sănătăţii, vieţii, stării materiale a omenirii va fi în secolul al XXI-lea cel puţin echivalent cu influenţa polimerilor sintetici, a*

Scanned with OKEN Scanner

ingineriei computerelor, a imagisticii medicale de rezonanţă magnetică şi a microelectronicii, cumulate pe parcursul întregului secol XX!"

Secolul acesta marchează intrarea în Epoca materialelor cu aplicaţiile cele mai de vârf ale acestora în medicină. Astăzi, se poate vorbi de ştiinţa şi ingineria materialelor de inspiraţie biologică.

1.5. MATERIALE ŞI STRUCTURI BIOMIMETICE

Biologia a polarizat continuu atenţia omului şi prin aceasta a influenţat şi condus constant dezvoltarea de noi materiale şi tehnologii. Copierea unor idei de la natură, de către om, s-a făcut fără ca acestei laturi a cunoaşterii să i se fi atribuit caracterul de ştiinţă şi numele de *biomimetică* sau *bionică*.

Inginerii, designerii şi arhitecţii privesc, adesea, către natură, pentru a descifra şi prelua din ideile testate de mii de ani în biosferă, sisteme uluitoare de o mare diversitate pe care oamenii de ştiinţă le privesc ca surse de inspiraţie pentru noi dispozitive şi sisteme biomedicale. Bioinspiraţia şi biomimetica şi-au spus, de aceea, cuvântul în multe sectoare de activitate, cum ar fi: transportul aerian, dinamica marină, designul şi structura sistemelor, comunicaţii, comportamentul de coopĕrare socială, proiectarea de noi materiale, bioacustică etc.

Leonardo Da Vinci s-a inspirat în desenele sale de la natură. Fiind un fin cunoscător de anatomie, zoologie, botanică, geologie, optică, hidro- şi aerodinamică, a putut stabili legături între modelele naturale şi mecanismele pe care le vedem astăzi, a găsit soluţii practice, în timp ce contemporanii săi căutau în Biblie răspunsuri la întrebările timpului.

Insectele constituie o stânjenitoare abundenţă de design-uri, o sursă inepuizabilă de inspiraţie pentru noi materiale şi tehnologii, incluzând aici: ochii antireflexivi ai fluturilor cărora le permit să vadă în condiţii de lumină slabă; filmele nanostructurate antireflexive ale aripilor unor insecte; exoscheletul unor colioptere îşi schimbă culoarea de la verde la negru, în funcţie de mediul înconjurător, sugerând materiale inteligente care acţionează ca senzori de umiditate; culori structurale ce nu se estompează şi sunt mai strălucitoare decât orice pigment etc.

Recent, la Universitatea Harvard, a fost realizat un ţânţar robot, la scara de 1:1. Insecta mecanică va fi utilizată în operaţiuni de supraveghere sau căutare şi salvare, ca spion în mediile urbane şi pe câmpurile de luptă, putând detecta substanţe străine mediului. Roboţii săritori sunt o soluţie biomimetică pentru deplasarea pe teren accidentat.

Scanned with OKEN Scanner

Circulaţia microfluidelor este manipulată de către microorganisme, prin mecanisme specifice datorate microcililor prezenţi pe suprafeţele lor externe.

Vezica înotătoare a peştilor corespunde tancului de balast al submarinelor, iar tehnica de înot specifică peştilor „bony fish", din clasa Osteichthyes, a fost copiată în realizarea de submarine agile, fără elice, propulsate de aripioare mecanice.

Liliecii emit sunete de frecvenţă înaltă şi îşi ghidează zborul. Folosind acest model al liliecilor, cercetătorii au dezvoltat radarul şi sonarul. Aparatul de hidrolocaţie al delfinului este încă superior atât ca precizie, cât şi ca putere aparatelor navelor de suprafaţă şi a submarinelor de astăzi.

Încă din secolul al IV-lea î.Hr., când Aristotel se minuna cum o şopârlă „poate să alerge în sus şi în jos pe un copac, stând oricum, chiar şi cu capul în jos". Abilitatea de a adera extrem de eficient la diverse suprafeţe, precum şi reversibilitatea repetativă a acestor forţe de adeziune, în timp real, sunt proprietăţi dorite, dar rar întâlnite, folosind materialele şi tehnologiile convenţionale. Aceste proprietăţi pot fi observate în natură la multe insecte şi şopârle care se pot susţine pe orice fel de suport, uscat sau umed, lucios sau rugos, luând poziţii care sfidează gravitaţia.

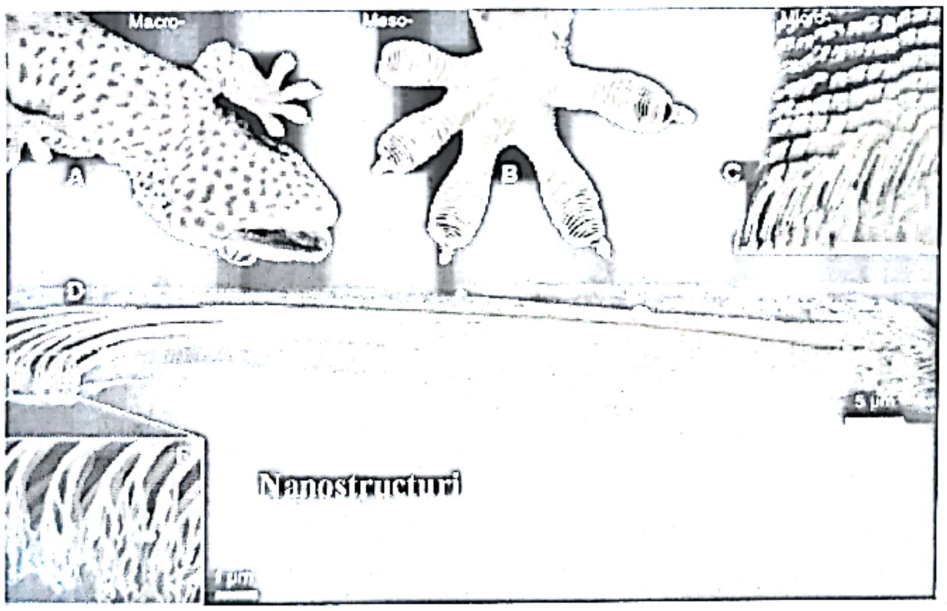


Fig. 1.5. Ierarhia structurală a sistemului adeziv al şopârlei Tokay la scară: a. Macro; b. Meso; c. Micro; D. nano

O adevărată lecţie de inginerie a naturii, sistemul adeziv al şopârlei constituit (Fig. 1.5.) din aproximativ 2.10^{12} filamente / cm^2, cu vârfuri spatulate, dispuse pe pernuţele degetelor, fiecare filament având o grosime de 100

nm, nu se udă şi nu se murdăreşte şi, mai mult, numai unul dintre picioare poate susţine o greutate de până la 90 kg, adică de circa 300 de ori greutatea totală a şopârlei.

Adezivitatea extremă se datorează structurii ierarhizate fibrilare, care funcţionează ca un adeziv inteligent, interacţionând la nivel molecular cu suportul, doar prin legături fizice de tip Van der Waals [13, 14, 15, 16].

Se constată că sistemele fibrilare adezive din natură au evoluat independent la specii diferite [17, 18].

Materialele adezive inspirate de picioarele insectelor pot „dota" roboţii cătărători pe suprafeţe verticale de tipul Mini-Whegs^{TM} (Fig. 1.6.)

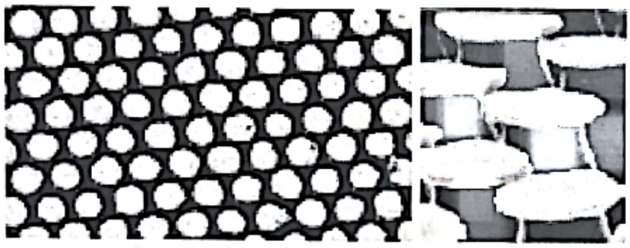


Fig. 1.6. Microstructură biomimetică fibrilară adezivă în formă de ciupercă [19]

Se încearcă reproducerea sistemului adeziv al şopârlelor prin adaptarea unui sistem fibrilar sintetic, pentru ca benzile adezive să fie utilizate la înlocuirea firelor de sutură în închiderea rănilor, la adezivii bandajelor şi ai sistemelor de eliberare transdermale, în corectarea herniilor, în laparoscopie etc. Se prevăd, de asemenea, şi aplicaţii tehnice de vârf, în domenii ca cel aerospaţial şi cel subacvatic (de exemplu: tălpile şi mănuşile costumelor aeronauţilor, adezivi pentru intervenţiile de urgenţă în submersie) etc. [20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29].

Un alt sistem adeziv de excelenţă este acela observat la multele specii de scoici care se prind în mediul acvatic de orice suport, probând indiferenţă în faţa uriaşelor forţe marine care le lovesc în mod obişnuit. Moluştele produc specific anumite filamente (engl. *byssus threads*) care sunt comparabile cu fibrele de Kevlar şi fibrele de carbon, de cinci ori mai tari şi de şaisprezece ori mai elastice decât fibrele tendonului uman [30] (Fig. 1.7.). Piciorul moluştei este un dispozitiv ingenios care depistează suprafeţele cele mai propice, le curăţă şi, apoi, în doar câteva minute, ţese fire de prindere, utilizând proteine stocate în glandele specializate din structura sa anatomică. Proteina în cauză este singura care prezintă segmente colagenice şi segmente elastinice în aceeaşi structură terţiară, îndeplinind atât rol de rezistenţă la trac-

Scanned with OKEN Scanner

ţiune, cât şi rol de absorbant de şocuri. Cercetătorii au descoperit că moluştele adsorb din mediul acvatic, la fel ca şi hrana, fier pe care îl folosesc apoi ca agent de reticulare al proteinelor fibrilare, crescând rezistenţa la tracţiune a firelor de ancorare. Este prima dată când se dovedeşte că fierul este esenţial în formarea unui biomaterial necristalin.

Prin determinări mecanice, s-a constatat că fibrele se ancorează şi aderă la fel de puternic la toate suprafeţele, nefăcând excepţie nici regele încoronat al alunecării şi antiaderenţei, Teflonul (politetrafluoretilena).

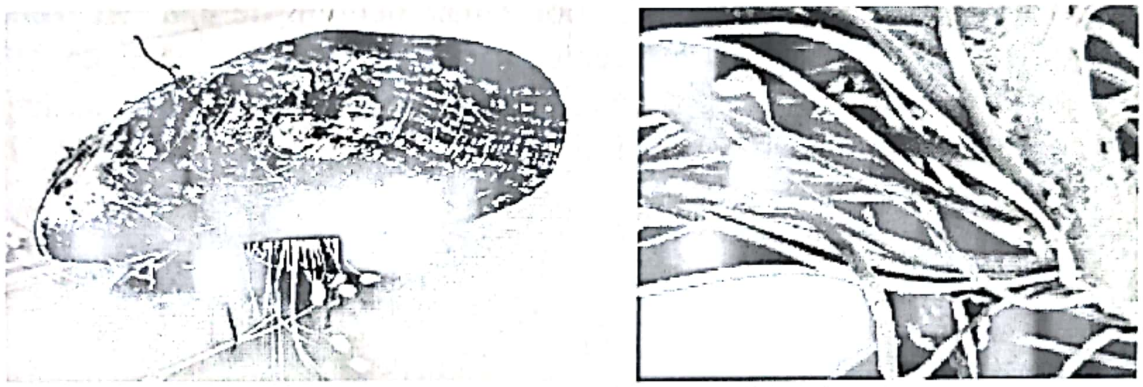


Fig. 1.7. Fire de ancorare ale scoicilor

Aceste cunoştinţe conduc la noi materiale bionice şi biomateriale, cu întrebuinţări din cele mai spectaculoase. Nu ar fi un lucru extraordinar ca în timpul intervenţiilor chirurgicale, medicii să nu mai coase, ci să lipească biomimetic cu un adeziv puternic, netoxic, rezistent la apă şi cu bioresorbţie controlată, rănile, inciziile sau fracturile etc. pacienţilor? Acest aspect va fi, cu siguranţă, posibil în curând.

Mai mult, combinând caracteristicile importante ale celor doi adezivi, *gecko* şi *proteinele din firele byssus*, noul material, cunoscut generic ca *geckel* probează caracteristici puternice şi reversibile de lipire – dezlipire atât în mediu uscat, cât şi în mediu umed [31], ţintind aplicaţii în medicină, ştiinţa materialelor, în proiecte militare.

Biomimetica are mulţi paşi de făcut.

Designul constituie cheia de boltă a funcţiei, cu înţelesul de cerere de produse folosite de om peste tot în lume. Se estimează că 70 % din costurile de realizare, de producţie şi de utilizare a unui produs sunt dictate de designul iniţial al acestuia [32].

Scanned with OKEN Scanner

În construcţii, s-au utilizat unele învăţăminte de eficienţă, cum ar fi: fagurele albinelor, mişcarea heliotropică a florii–soarelui (pentru iluminarea naturală a locuinţelor pe tot timpul zilei), sistemele de ecluze ale castorilor.

În anii 1850 – 1851, inspirându-se de la structura plutitoare de susţinere a lotusului amazonian (*Victoria amazonica)*, arhitectul englez sir Joseph Paxton a construit renumitul Palat de Cristal la Londra. O altă proprietate extrem de apreciată, observată la frunzele de lotus, numită şi „lotus effect", este capacitatea de autocurăţire, patentată de Wilhelm Barthlott în anul 1982 (Fig. 1.8.).

Studiul pânzei în formă de clopot a păianjenului de apă Argyroneta (vezi cap. 15) a condus la proiectarea cupolei stadionului din München, de către arhitectul Otto Frei. Şi arhitectul Pier Luigi Nervi a imitat structura formelor vegetale, atunci când a proiectat şi construit Palatul Expoziţiilor din Torino.

Fig. 1.8. Lac cu frunze de lotus amazonian victorian şi Palatul de Cristal

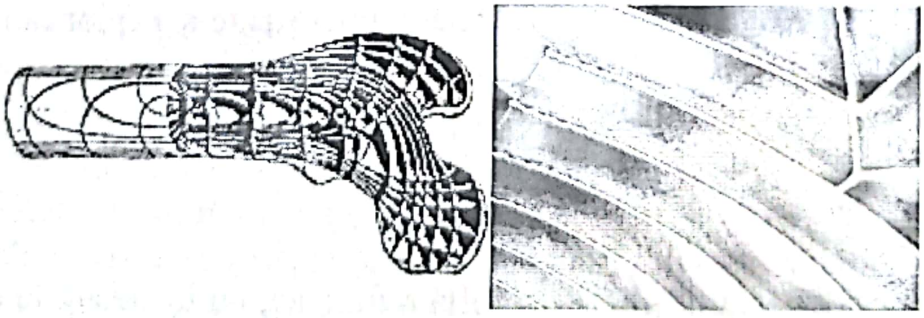


Fig.1.9. Capul femural şi structura biomimetică corespondentă

Chiar dacă turnul Eiffel este considerat ca fiind o minune a ingineriei, trebuie ştiut faptul că imaginarea structurii acestuia a pornit de la anatomistul Hermann von Mayer, cu 40 de ani înainte de construcţia propriu-zisă. În anul 1866, Karl Cullman, vizitând la Zürich laboratoarele profesorului

Scanned with OKEN Scanner

Hermann von Mayer, a realizat că structura capului femural, care poate susține o tonă în plan vertical, nu este alcătuită dintr-un os monolitic, ci din serii ordonate de lamele (*trabeculae*) aranjate de-a lungul liniilor de forță (Fig. 1.9.).

Translând în arhitectură aceste observații, Karl Cullman a calculat structura turnului Eiffel, prin construirea, de-a lungul unor linii de forță, a unor structuri noncentralizate.

În mod similar, copiind structura osului spongios, arhitecții şi inginerii au realizat construcții îndrăznețe, rezistente şi flexibile, în situații extreme (Fig. 1.10). Suprafețele curbe realizate şi testate de către natură, cum ar fi coaja de ou, cochiliile melcilor şi scoicilor, prezintă rezistențe mecanice importante, dacă luăm în considerație grosimea şi mărimea suprafeței pereților mineralizați, exemple de biocompozite şi de structuralizări care au inspirat, de exemplu, realizarea acoperişului teatrului de la Daka (Fig. 11.).

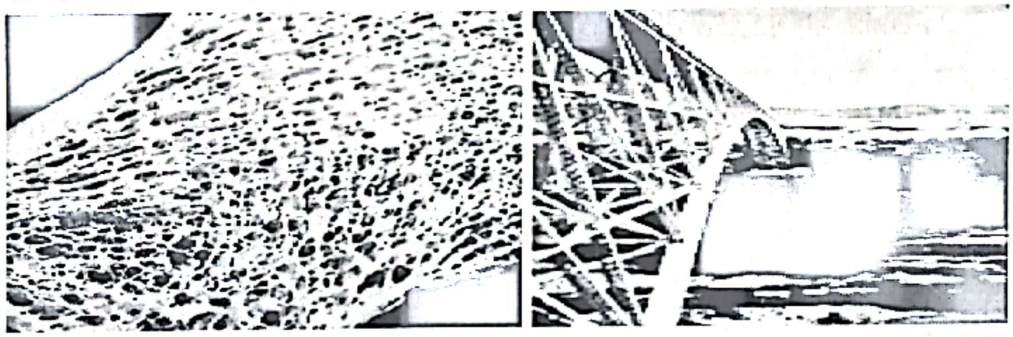


Fig. 1.10. Osul spongios şi structuri biomimetice metalice în rețea

Filigranul construit de organismele marine din specia Radiolaria, cu schelet structurat în forme hexagonale, a devenit un adevărat concept în construcțiile uşoare, de mari dimensiuni din metal şi sticlă sau materiale compozite [(de ex.: pavilionul EXPO'76 din Montréal, Centrul Național de Arte Dramatice din Bejing (Oul, 2008) etc.)].

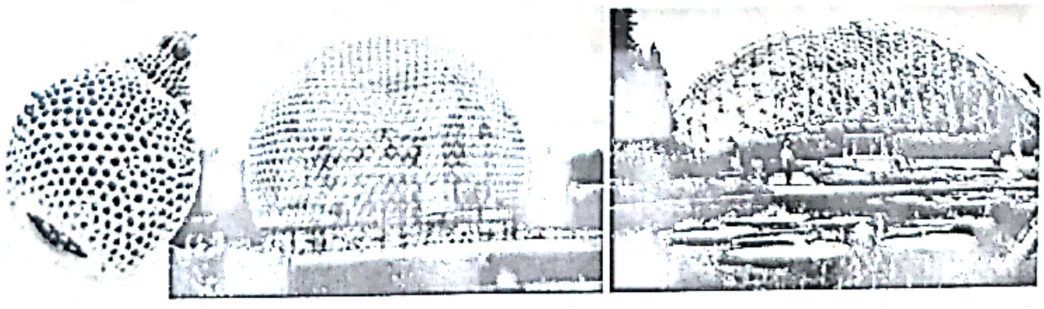


Fig. 1.11. Structuri biomimetice în arhitectură şi în construcții

Scanned with OKEN Scanner

Pereţii şi acoperişul Centrului Naţional Acvatic, Cubul de apă de la Beijing, ne aminteşte de structura clăbucilor de săpun, cu linii de contact ce se racordează conform tensiunilor superficiale, iar impunătorul Stadion Naţional, Cuibul de pasăre, este o lecţie de simplitate, forţă şi de eleganţă (Fig. 1.12.).

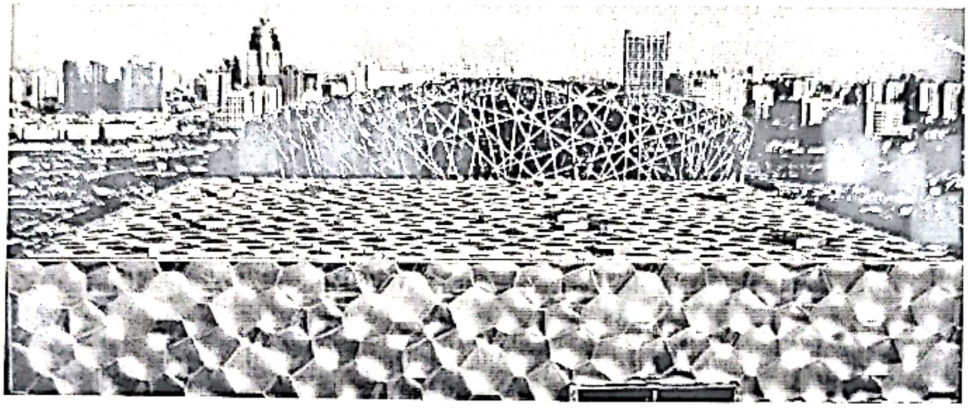


Fig. 1.12. Cubul de apă (în prim plan) şi Cuibul de pasăre, Beijing, 2008

Muşuroaiele termitelor măsoară până la 7,5 m înălţime, ceea ce ar echivala, pentru oameni, cu zgârie-nori înalţi de 9,6 km. Unele muşuroaie rezistă aproape o sută de ani, materialul de construcţie fiind unic: pământ amestecat cu salivă. Aceste construcţii prezintă un sistem sofisticat de aer condiţionat, alcătuit din canale şi conducte prin care circulă aerul (Fig. 1.13.).

Fig. 1.13. Muşuroaie de termite. Ray Norris, via Wikimedia Commons, 2005

De aceea, s-a studiat modalitatea de reglare a temperaturii, a umidităţii şi a fluxului de aer în muşuroaie, pentru a se proiecta clădiri durabile, confortabile şi cu cheltuieli minime de întreţinere. Astfel, s-a construit după

Scanned with OKEN Scanner

criterii biomimetice Eastgate Centre din Harare, Zimbabwe, arhitect fiind Mick Pearce (proiect 1991-1996) (Fig. 1.14.).

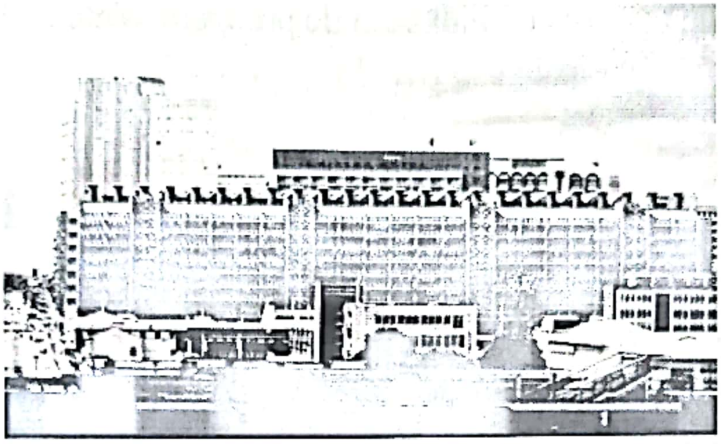


Fig. 1.14. Eastgate Centre, Harare, Zimbabwe

Omul a învăţat de la păianjeni să construiască economic acoperişuri de mare întindere, rezistente şi uşoare, aşa cum sunt Stadionul Olimpic şi grădina zoologică din München, Germania, stadionul naţional de atletism din Sydney, aeroportul din Denver, Canada şi din Jeddah, Arabia Saudită (Fig. 1.15).

Fig. 1.15. Pânze de păianjen şi acoperişuri biomimetice [33]

Mulţi biosenzori (de infraroşii etc.) şi convertoare energetice (clorofila, luciferina) se dovedesc a fi încă mai performante decât aceia realizaţi de către om. În criza energetică în care pătrundem, bioluminiscenţa ar putea fi imitată şi reprodusă controlat, constituind o soluţie pentru iluminat. Se prevede, de asemenea, ca în viitor să funcţioneze pe glob fabrici de hidrogen fotolitic, care să asigure o treime din necesarul de energie al planetei.

Încă de acum 300 de ani, albinele, prin structura celulei fagurelui, au contribuit indirect la corectarea tabelelor de logaritmi [33].

Scanned with OKEN Scanner

În 1948, Georges de Mestral conştientizează potenţialul scaieţilor, ca o metodă de îmbinare a două suprafeţe: una fină şi alta cu cârlige, observaţie care a condus la apariţia unei industrii extrem de prospere: Velcro (Fig. 1.16).

Fig. 1.16. Sistemul Velcro. Se evidenţiază sistemul cârlig şi sistemul adeziv

„Ciulinii din blana unui câine au dus la inventarea *ariciului* (Velcro). Acesta este un exemplu de biomimetică – tânăra ştiinţă care adaptează designuri ale naturii pentru a rezolva probleme moderne. Acum este posibil să înceapă să se maturizeze“ [34].

Fenomenul de autoasamblare a unor materiale biomoleculare cere dezvoltarea unei noi discipline de studiu aflată la intersecţia dintre biologie moleculară, fizică şi ştiinţa materialelor. Controlul autoasamblării moleculelor complexe în structuri ierarhice bine definite este o cale de fabricare a nanostructurilor. Aceste structuri la scară nanometrică pot fi realizate din biopolimeri proteici, cum ar fi virusul mozaic al tutunului, actină, tubulină, proteine capsidice şi fibroase etc. [35, 36].

Fiecare specie, chiar şi acelea care au dispărut, reprezintă o poveste de succes, optimizată prin milioane de ani de selecţie naturală. Janine M. Benyus afirma că, după 3,8 miliarde de ani de „cercetare şi dezvoltare“, eşecurile sunt fosilele, iar ceea ce ne înconjoară este secretul supravieţuirii. *„Natura ar trebui să devină mentorul lumii şi singura cale de a învăţa de la natură este aceea de a o păstra“* [37].

Se caută încă răspunsuri la întrebări, ca de exemplu: cum de păsările şi peştii sunt capabili să zboare şi să navigheze distanţe lungi?; cum de păsările pot zbura folosindu-şi numai propria forţă musculară?; cum de viperele detectează căldura (razele infraroşii cu lungimea de undă de 0,1 – 0,15 mm)? Aceste exemple evidenţiază abilităţi extraordinare de capacitate de adaptare la mediu.

Soluţiile şi ideile prezentate de natură în anii de evoluţie ne fac să ne gândim la o inteligenţă infinită şi divină, şi pare că această virtute a fost blocată la noi, în noi; ne-am bucurat de privilegiul de a interoga natura cu ştiinţele noastre, dar, totodată, trebuie să înfruntăm cunoştinţele noastre cu ceea ce nu ştim [38].

Scanned with OKEN Scanner

Firul mătăsii de păianjen este mai rezistent, la acelaşi diametru, decât cel mai tare oţel modern. În 2700 î.Hr., chinezii, aplicând aşa-numita biomimetică, au studiat mătasea de păianjen şi au încercat să îi replice structura, pentru a o putea produce la scară manufacturieră.

Democritos (400 î.Hr.): „copiind animalele învăţăm lucruri mai importante, suntem învăţăcei ai păianjenilor, învăţând cum să ţesem, învăţăm de la rândunică să construim case, de la privighetoare arta cântecului...".

Zborul păsărilor a fost încercat în anul 1400 î.Hr. de către arhitectul Dedalus, care a mimat structura aripilor păsărilor, folosind un cadru din lemn şi ceară. Deşi tentativa de a zbura peste labirintul din Knossos – Creta a fost nereuşită, acesta a deschis calea unor noi încercări. Icar a căzut, rămânând în mitologie ca prima eroare a bionicii şi a biomimeticii.

Penele principale ale răpitoarelor, în formă de degete, precum şi studiul semințelor de arțar au condus la patentarea aparatelor de zbor cu geometrie variabilă, în crearea de aripi care îşi schimbă forma în timpul zborului, reducând rezistența la înaintare şi crescând eficiența combustibilului consumat.

Multe animale evită să fie descoperite, prin a se confunda cel puțin coloristic (culori de dezagregare) cu mediul în care trăiesc. Calamarul şi alte moluşte scuipă cerneală în apă pentru a se proteja. Regăsim aceste elemente biomimetice în domeniul apărării, prin echipamentele de camuflaj a personalului şi a tehnicii şi, respectiv, perdelele de fum pentru a masca şi proteja trupele în mişcare.

Asemănător pielii delfinilor, costumul înotătorului care îi acoperă în întregime corpul reduce frecarea cu apa, crescând astfel viteza. Proprietăți similare conferă şi pielea de rechin ce prezintă pe suprafață solzi nanometrici, ce împiedică algele şi crustaceele marine din subclasa *Cirripedia* să se fixeze de acest suport. Această observație este utilă ca aplicație la tratarea carenelor vaselor.

Blana urşilor polari are proprietăți asemănătoare fibrelor de sticlă, conducând lumina solară direct la pielea animalului, încălzindu-l.

Găsind echivalentul tehnic al particularităților adaptative ale peştelui cufăr galben, tehnicienii de la Mecedes–Benz au adoptat, în anul 2005, conceptul companiei despre automobilul bionic (Fig. 1.17.).

Îmbinarea dintre intuiția biologică şi pragmatismul ingineresc este capitală pentru succesul biomimeticii. Şi aici, partea care şchiopătează este ingineria pentru care încă viața reprezintă un fenomen complex fără limite, imposibil de creat şi de controlat în adevăratul sens al cuvântului.

Scanned with OKEN Scanner

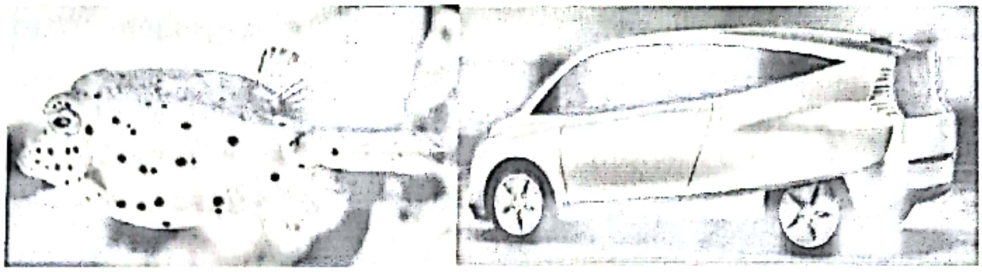


Fig. 1.17. Conceptul de automobil bionic Mercedes–Benz, 2005

1.6. APLICAŢII ALE BIOMIMETICII

Din cele prezentate în subcapitolul *Materiale şi structuri biomimetice*, rezultă o mare diversitate ale aplicaţiilor biomimeticii, care în viitorul apropiat, va avea un larg câmp de dezvoltare.

Un dispozitiv bionic antic a fost descoperit în 1858, la Capua – Italia, reprezentând un picior artificial făcut din lemn şi cupru, despre care se crede că datează din anul 300 î.Hr.

Se poate spune că din cele mai vechi timpuri suntem în era biomimeticii. Tot ce au întreprins oamenii cu invenţiile lor a fost să copieze, să mimeze natura în procesul său evolutiv de 3,8 miliarde de ani. Nevoile omului au evoluat mereu din epoca de piatră, în epoca bronzului, epoca fierului... epoca revoluţiei industriale din secolul al IX-lea, din secolul al XX-lea, al tehnicii, şi până astăzi, în epoca materialelor (vezi fig. 1.4.), având loc mari progrese cu aplicaţii deosebite şi în domeniul biomedical.

În secolul al XIX-lea şi începutul secolului al XX-lea, s-au adus îmbunătăţiri ale aplicaţiilor umane în bionică, precum a extremităţilor artificiale, a organelor, ochelarilor, dispozitivelor de auz, a dispozitivelor sau artefactelor dentare, a oaselor şi a altor obiecte de înlocuit părţi din organism. Richard P. Feynmann, distins cu premiul Nobel pentru fizică, a expus pentru prima dată principii ale nanotehnologiei în anul 1959.

Medicina bionică se referă la înlocuirea sau îmbunătăţirea unor organe sau părţi ale organismului cu versiuni mecanice. Implanturile bionice diferă de proteze, prin aceea că mimează foarte mult funcţia organică, uneori chiar depăşind-o.

În prezent, mişcarea biomimetică devine tot mai puternică la nivel global.

Bionica s-a dezvoltat în ţări ca Germania, unde se predau cursuri în diverse forme de învăţământ, Japonia, cu preocupări intense în biorobotică, Statele Unite şi Marea Britanie, unde multe societăţi comerciale finanţează

Scanned with OKEN Scanner

astfel de cercetări. De asemenea, în America Latină şi în Spania, există preocupări similare. În Mexic, se elaborează produse bionice.

Producerea de implanturi bionice se află într-o fază incipientă. Din comerţ, se pot achiziţiona câteva dispozitive bionice, dintre care cel mai cunoscut este implantul cohlear, dispozitiv destinat persoanelor care suferă de surditate. În anul 2004, au fost realizate inimi artificiale.

Mimarea structurilor biologice şi a controlului proceselor de sinteză şi de autoasamblare prezintă un înalt potenţial ştiinţific. Ingineria bionică este o ştiinţă pluridisciplinară, având scopul de a proiecta şi produce proteze activate de nervi, roboţi controlaţi de biosemnale sau chiar modele artificiale ale unor procese ce există doar în natură (de exemplu, vederea artificială sau inteligenţa artificială numită *cibernetică*).

Domeniul fascinant al nanobiotehnologiei care are la bază imaginarea de noi materiale sintetice la scară nanometrică, respectând arhitectura moleculelor relevante din punct de vedere biologic, va conduce, în final, la integrarea materialelor artificiale *in vivo* în cele naturale.

În anul 1991, profesorul japonez Iijima a obţinut structuri grafitice tubulare goale cu pereţi cilindrici, închise, cu capete semisferice de tip fulerenic, numite nanotuburi (Φnm x $L10^2$ nm), deschizând orizontul nanochimiei, a nanotehnologiilor şi a nanomaterialelor.

Tehnicile actuale de fabricare a nanoroboţilor, în continuă dezvoltare şi perfecţionare, pun premizele unui viitor apropiat, când aceste dispozitive ca entităţi funcţionale vor avea o multitudine de aplicaţii biomedicale. Ele vor permite medicilor să intervină precis la nivel celular şi molecular. Multe dispozitive, micro şi nanoroboţi, aşteaptă pe masa proiectanţilor noi tehnologii performante care să le permită a fi produse.

Nanoroboţii au fost propuşi pentru utilizare în diagnoză, în cercetarea farmaceutică, geriatrie, suplimentarea sistemului imunitar, împiedicarea mecanică a arteriosclerozei, modificarea ADN-lui *in vivo* etc. Un exemplu cunoscut este *respirocitul*, un nanorobot proiectat de Robert Freitas Jr., cu funcţie de celulă roşie artificială (fig. 1.18.) [3].

Respirocitele sau globulele roşii mecanice artificiale sunt nanoroboţi ale căror aplicaţii primare includ: substituirea sângelui, tratamentul anemiei, a dereglărilor peri- şi neonatale, a bolilor de plămâni, diagnoza şi terapia tumorilor, susţinerea respiraţiei artificiale în condiţii limită, prezervarea de organe etc. Respirocitele intră în compoziţia substituenţilor de sânge transfuzabili universali, liberi de agenţi patogeni, cu timpi de stocare nelimitaţi şi disponibili în orice cantitate. Globulele roşii mecanice sunt acceptate şi de către pacienţii care, din convingeri religioase, refuză transfuziile de sânge alogen.

Scanned with OKEN Scanner

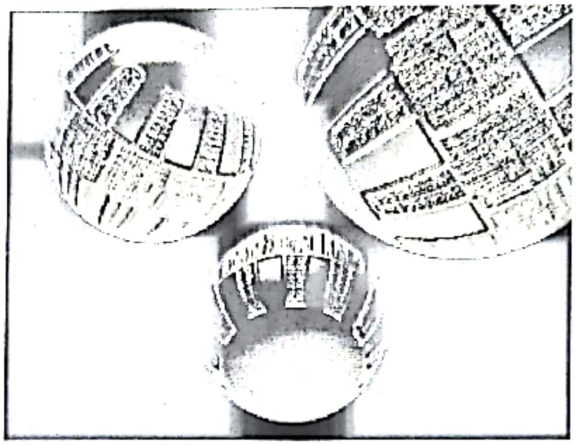


Fig. 1.18. Imaginea a trei respirocite la care se pot evidenţia suprafeţele exterioare ale senzorilor şi ale trioarelor moleculare

Oxigenarea suplimentară indusă de respirocite oferă posibilitatea tratării complete sau parţiale a tuturor formelor de anemie, incluzând anemiile acute cauzate de pierderile masive de sânge din traumatismele grave sau intervenţiile chirurgicale; anemiile secundare provocate de ulcerele duodenale şi gastrice, sângerarea menstruală excesivă, hemoroizi; anemiile ereditare, ca de exemplu, hemofilie, leptocitoză, siclemie, telasemie, deficienţe anemice endocrine; anemii cauzate de diverse boli incluzând: tuberculoza, sifilisul, febra tifoidă, reumatismul, blocajul renal cronic, cancerul; anemii hemolitice: hemoliza chimică (malarie, muşcături de şarpe etc.), hemoglobinuria paroxismală şi anemii cronice hemolitice, prin hipersplenism cauzat de ciroza ficatului, leucemie); anemii aplastice cauzate de intoxicaţii sau otrăviri, iradiere sau de alţi agenţi antimetabolici etc.

Perfuzia de respirocite este utilă în menţinerea oxigenării ţesuturilor pe timpul anesteziei, angioplastiei coronariene, a transplantului de organe şi a separării feţilor siamezi, în intervenţii chirurgicale pe cord deschis sau pe creier, în recuperarea postoperatorie cardiacă sau de bypass cardiopulmonar.

Administrarea unei doze terapeutice de respirocite, în scopul de a absorbi *in vivo* N_2 în locul O_2/CO_2, poate oferi scafandrilor posibilitatea unei decompresii rapide (1 sec.) şi sigure pentru o adâncime de lucru de până la 26 m. Fiecare doză suplimentară asigură decompresia pentru câte încă 16 m adâncime, iar timpul necesar decompresiei se prelungeşte sensibil [39].

Observându-se eficienţa sistemului imun al crocodililor, astăzi există intense preocupări de a descoperi diferenţele faţă de sistemul imun uman deficitar în faţa unor agenţi rezistenţi şi la antibiotice.

Scanned with OKEN Scanner

În Japonia, cercetările medicale reduc durerea unei injecţii folosind ace hipodermice care au margini fin zimţate, precum cele de pe trompa ţânţarului, pentru a minimiza stimularea nervilor.

Hermann von Meyer a studiat capul femural, evidenţiind faptul că există centre fără încărcătură care suportă întreaga greutate a corpului. Oricare restricţie corporală este redusă de posibilităţile mecanice. Şcoala lui Randall Berr, numită *neuroetologie computerizată*, este inclusă în domeniul legilor mişcării biologice şi al relaţiilor între biomecanică şi mişcările executate de roboţii automaţi.

Astăzi, premiul Feynmann, în valoare de 250 000 $ SUA, este oferit aceluia care va realiza în premieră un braţ nanometric robotizat.

Neurobiologul M. Nicolelis a reuşit, în anul 2000, ca o maimuţă, care avea implantaţi în creier electrozi, să îşi mişte un braţ robotic, prin intermediul propriilor biosemnale. Experimente mai recente demonstrează că această tehnică poate fi aplicată şi pe subiecţi umani. Strict vorbind, în domeniul sănătăţii, se fac progrese uriaşe în cadrul unităţii profesionale interdisciplinare a ingineriei şi a tehnicilor avansate, a biotehnologiei şi a bioelectronicii.

Realizarea funcţiei adaptative conjugă ştiinţa şi tehnologia mişcărilor pe care le pot executa animalele primare şi complexe, pentru a pune în armonie restricţiile anatomice ale unui organism în mişcare automată. Mişcările se află într-o relaţie cu ieşirile cerebrale, mai ales în cazul mâinilor care scriu semne şi desenează, relaţie care deja depăşeşte limitele biomimeticii propriu-zise.

K. Boahen a dezvoltat o retină din silicon care a fost capabilă să proceseze imagini similar aceleia umane. Prima lentilă multifocală intraoculară a fost implantată în 1986 [40]. În anul 2006, W.F. Curtis a patentat un nou material biomimetic, un hidrogel pentru cornee artificială, numit Duoptix^{TM}, alcătuit din două reţele polimerice tridimensionale interconectate: polietilenglicol şi acid poliacrilic. *In vivo*, celulele invadează reţeaua, producând o reţea de fibre colagenice care întrepătrund reţeaua sintetică, rezultând joncţiunea dintre implant şi ţesut.

Hidrogelurile sintetice sunt în mediul biologic materiale inerte şi pot fi modificate chimic prin grefarea de peptide, în scopul modificării proprietăţii celulelor de a adera la interfeţele biomaterial / ţesut şi de a interacţiona cu acesta [41, 42]. La hidrogelurile biomimetice, disponibilitatea liganzilor legaţi covalent de celule este dependentă de lungimea catenei moleculei spacer [43]. S-au obţinut hidrogeluri biomimetice pentru lentile de contact care joacă şi rol de rezervor de medicament cu eliberare controlată [44, 45].

Scanned with OKEN Scanner

Biopolimerii, cum ar fi colagenul, elastina, fibroina, draglina, fibronectina, fibrina, amidonul, celuloza bacteriană, dextranii, mananii, alginaţii, pectinele, chitina, chitosanul, glicozaminoglicanii etc. şi-au găsit o multitudine de aplicaţii biomimetice în domeniul medical (inginerie tisulară, implantologie, medicină regenerativă, fire de sutură, bureţi, filme, biomateriale poroase, substituenţi plasmatici, purtători de medicament cu eliberare controlată şi preparate de uz farmaceutic, oftalmologie etc.), fiind dată similitudinea lor cu matricile extracelulare şi ceilalţi biopolimeri din organismul uman [46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58].

Ingineria tisulară, încercând să elimine complicaţiile asociate transplanturilor clasice, utilizează substituenţi tisulari care pot susţine funcţia ţesutului lezat în timpul regenerării şi care se doresc a se integra în ţesutul nativ. Substituenţii tisulari alcătuiţi din biomateriale şi sisteme interactive sau viabile, implanturile multifuncţionale ce vor înlocui temporar sau definitiv organe, inclusiv organe vitale, posibilitatea substituirii unor funcţii de control motor sau analiza senzorială la nivelul sistemului nervos, prin utilizarea unor CIP-uri, reprezintă, în totalitate, *modele biomimetice* aplicate în medicină.

Ingineria tisulară se confruntă încă cu multe dificultăţi, dintre care:

– modularea aderenţei, proliferării şi a diferenţierii controlate a celulelor pe suport şi, în special, a celulelor stem;

– eliberarea controlată susţinută a substituentului tisular de factori specifici sau de plasmid ADN (ca de exemplu, factorii de creştere stimulatori ai angiogenezei etc.);

– dezvoltarea de biomateriale biomimetice inteligente, cu o bună compatibilitate superficială şi structurală şi cu o activitate biologică specifică, pentru stimularea predictibilă, controlabilă şi obţinerea răspunsului biologic vizat în condiţiile date.

Numai viziunea cuprinzătoare asupra celulelor, factorilor inductori, a genelor, a suporturilor, a biomaterialelor şi a relaţiilor dintre acestea la nivel molecular, poate conduce la succesul proceselor reparatorii şi la obţinerea unor substituenţi tisulari performanţi.

Ingineria tisulară moleculară, urmaşă a ingineriei tisulare şi a biologiei moleculare, a făcut progrese uimitoare în ultimii ani.

Ingineria tisulară, în tandem cu medicina regenerativă, sunt atent vegheate de *ingineria biomimetică*.

Este adesea uşor de recunoscut excelenţa unei soluţii biologice, dar pot fi extrem de dificil de înţeles mecanismele care îi stau la bază. Biomimetica a trecut etapele primare, de reproducere a unor structuri macroscopice naturale, nedepăşind barierele microdimensionalului. Cu metodele noi

Scanned with OKEN Scanner

de investigare şi analiză, când vor fi elucidate căile celulare de biosinteză, dar, mai ales, de construcţie, diferenţele dintre biomaterialele de sinteză şi cele naturale se vor estompa (Fig. 1.19.). Biomimetica va acţiona atunci la nivel molecular şi întreaga gamă de activitate se va schimba.

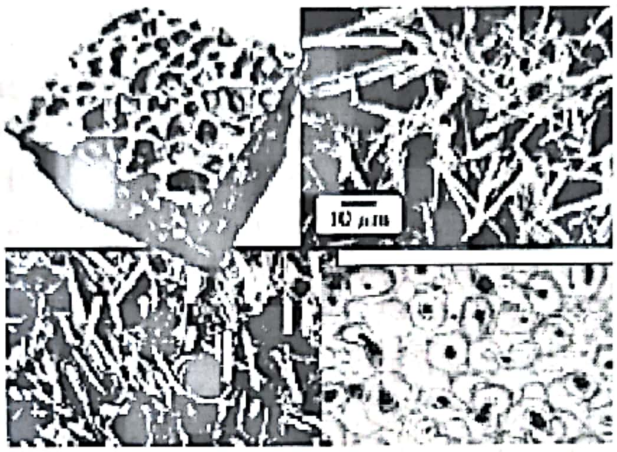


Fig. 1.19. Materiale biomimetice avansate

J. Vincent arată că: „Biomimetica înfloreşte în prezent datorită faptului că omului îi stau la dispoziţie noi tehnici performante de investigare şi de manipulare a materialelor şi a substanţelor chimice la nivel molecular".

Începem să înţelegem materialele la acest nivel, în scopul dezvoltării capacităţii tehnologice de reproducere a metodelor de sinteză, dar, mai ales, de control, ale lumii vii asupra structurilor 3D şi a ierarhizării acestora.

Implantologia se află la o răscruce provocată de evoluţia conceptuală a implanturilor, trecându-se de la implantul clasic, spre implantul bioartificial sau biomimetic, care oferă noi avantaje postoperatorii, prin scurtarea timpului de vindecare în cazul, de exemplu, al osului, al cartilajului, al pielii, al vaselor de sânge, al valvelor cardiace etc. După principii biomimetice, includerea în sistemele implantabile cu mai multă structură biologică, adică de viaţă, conduce la o asemănare mai pronunţată a implantului cu ţesutul nativ, până la nivelul la care implantul biomimetic participă la procesul normal de remodelare tisulară.

Există două metode uzuale de obţinere a grefelor similare celor autologe:

– modele directe pentru refacerea *in vivo* a culturilor minimale, pe suport biodegradabil, prin prelevarea unor celule normale de la pacient, apoi depunerea lor pe un suport care, implantat imediat, stimulează refacerea ţesutului lezat;

Scanned with OKEN Scanner

– implanturi viabile şi grefe tisulare, culturi celulare pe termen lung care mimează ţesutul nativ, prin prelevarea unor celule normale de la pacient şi însămânţarea acestora pe suporturi biodegradabile 3D, care conduce la generarea *in vitro* a unor matrici native, prin activitatea normală a celulelor, ca ţesuturi perfect funcţionale.

Ţesuturile native prezintă *in vivo* structuri tridimensionale (3D) bine organizate şi extrem de heterogene. Acestea sunt alcătuite din straturi multiple suprapuse, membrane, structuri tubulare şi canale. Fiecare dintre funcţiile ţesutului necesită existenţa unor componente specifice, celule şi materiale, la scară micronanometrică. Matricea extracelulară constituie suportul natural care menţine arhitectura tridimensională a ţesutului, controlează proliferarea celulară, motilitatea şi migrarea celulară.

Obţinerea de suporturi în 3D din biopolimeri cu o arhitectură biomimetică, probând proprietăţi cum ar fi: controlul diferenţierii celulare, migrarea celulară, producerea matricei celulare şi organizarea tisulară, constituie garanţia regenerării, reconstruirii ţesutului lezat sau bolnav şi a refacerii funcţiei sale native [59, 60].

Suporturile tridimensionale, poroase, pentru culturi celulare concepute biomimetic, sunt alcătuite din biopolimeri naturali sau modificaţi chimic, singuri sau în amestec cu alţi biopolimeri (colagen, fibrină, draglină, glicozaminoglicani, celuloză bacteriană, chitină, chitosan, elastină etc.) [61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74] sau polimeri de sinteză (acizii polilactic şi poliglicolic sau copolimeri ai acestora, poliuretani, policaprolactone, politri-metilencarbonaţi etc.) [75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87].

Strategiile de obţinere a suporturilor artificiale tisulare se bazează pe abordarea biomimetică a creşterii celulare şi a probării activităţilor lor specifice. Se accentuează importanţa abordării biomimetice a sistemelor implantabile (Fig. 1.20.) [88].

Ţinând cont de diversitatea ţesuturilor şi a funcţiilor pe care acestea le îndeplinesc, în conceperea biomimetică a suporturilor 3D se porneşte de la cele două modele limită: suporturi 3D bogate în celule şi suporturi 3D bogate în reţeaua matricei, rezultând tipuri intermediare care *in vivo* au tendinţe compensatorii, migrând, din punct de vedere al constituţiei şi al proprietăţilor, de la un tip extrem la celălalt.

Ingineria tisulară se dezvoltă extrem de rapid, pe bază de tehnici pentru realizarea unei mari varietăţi de ţesuturi atât *in vitro*, cât şi *in vivo*, folosind suporturi, matrici de biopolimeri sau / şi polimeri–biopolimeri, pentru creştere tisulară, în scopul înlocuirii ţesuturilor distruse, afectate sau dispărute,

Scanned with OKEN Scanner

cu substituenţi biologici compatibili (substituenţi sanguini, substituenţi osoşi, substituenţi de piele, substituenţi vasculari, substituenţi de ligamente şi tendoane, substituenţi de cartilaj etc.) şi de a restabili funcţia prin aportul de elemente vii ce devin integrate la nivelul pacientului.

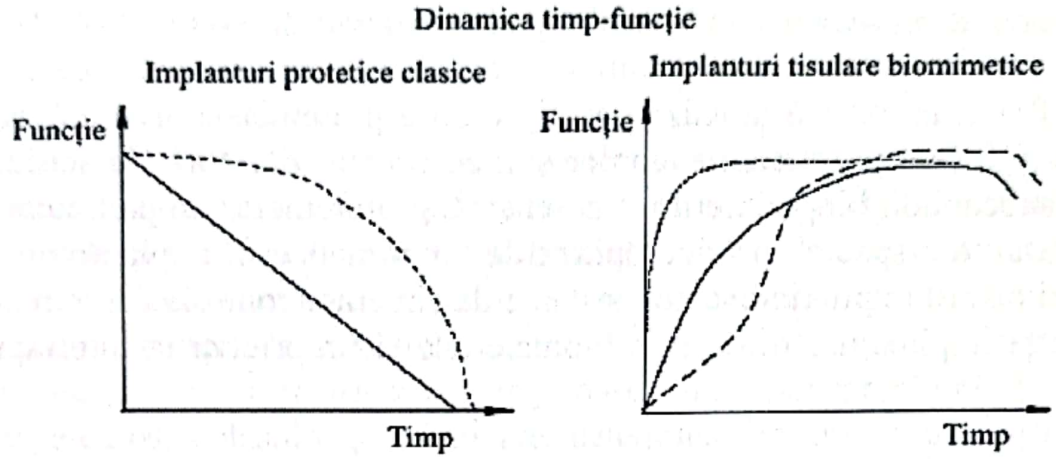


Fig. 1.20. Schema teoretică a refacerii funcţiei în timp la implanturi protetice clasice, comparativ cu sisteme implantabile ale ingineriei tisulare

Crearea şi perfecţionarea de noi materiale biomimetice şi de tehnici pentru realizarea suporturilor 3D purtătoare de celule constituie o strategie complexă care promite îmbunătăţirea adeziunii, diferenţierea şi creşterea celulară.

Materialele compozite prezintă o deosebită importanţă în aplicaţiile medicale, prezentând versatilitate şi mimând cel mai bine ţesuturile vizate a fi substituite. Compozitele biomimetice şi biocompozitele sunt utilizate frecvent pentru acoperirea implanturilor, în reconstrucţia osoasă şi în aplicaţiile dentare, maxilo-faciale, în chirurgia spinală, în protezarea articulară etc. Cimenturile osoase sunt larg utilizate în ortopedie pentru ancorarea implanturilor de os, în reconstrucţia osoasă şi pentru eliberarea controlată de principii active [89].

Nanocompozitele sunt amestecuri de constituenţi la scară nanometrică, care se aseamănă cel mai mult cu biocompozitele, probând adesea calităţi superioare microcompozitelor şi pot fi sintetizate, în mod surprinzător, prin tehnici şi condiţii simple şi ieftine, ca şi modificarea sau adaptarea chimică a unor interfeţe implant – mediu biologic [90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105].

Se remarcă, în momentul de faţă, două tendinţe, diametral opuse, în conceperea şi realizarea biomimetică a suporturilor tisulare 3D: a) pornind de la biologie, apare reducerea progresivă a complexităţii ţesuturilor native vii (de exemplu, decelularizare tisulară); b) pornind de la artificial, este evidentă

creşterea complexităţii elementelor constitutive (de exemplu, agregate proteice, bureţi, meşe, acoperiri biopolimerice ale interfeţelor implant – ţesut, compozite cu porozitate controlată etc. [106]).

Iată un concept cu un uriaş potenţial tehnologic, cu aplicaţii în domenii biomedicale (de exemplu, sisteme de eliberare controlată a principiilor active, biosenzori, ţesuturi şi organe artificiale şi bioartificiale).

Prezenta lucrare tratează pe larg despre proteinele fibroase (vezi volumul al II-lea) şi aplicaţiile tehnice şi medicale ale acestora, de aceea, şi în acest subcapitol, biopolimerilor, în general, şi proteinelor, în particular, li se acordă un loc special, privind aplicaţiile biomimetice în implantologie, suporturi pentru ingineria tisulară, sisteme de eliberare controlată a principiilor active şi implicaţiile în diverse biomateriale şi proprietăţi la interfaţa biomaterial / implant.

Osul este un biocompozit înalt ierarhizat, format din 65 % minerale, 25 % compuşi organici, colagen de tip I şi V (> 95 %, respectiv < 5 %) şi 10 % apă. Se disting fibrile mineralizate şi nemineralizate de colagen care prezintă diverse organizări în structura biocompozită. Componenta celulară este reprezentată de trei tipuri distincte de celule: osteoblastele (producţie), osteoclastele (resorbţie) şi osteocitele (întreţinere). Osul are capacitatea specială de a se vindeca şi a se remodela fără a forma cicatrici; colagenul care constituie matricea fibroasă este mineralizat cu hidroxiapatită, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, care este suficient de insolubilă pentru a fi stabilă în ţesut şi, în acelaşi timp, reactivă pentru a fi continuu absorbită şi reformată [5].

Riscul potenţial de transmitere a hepatitei virale sau SIDA de la alografe a condus la luarea în considerare a diferiţilor substituenţi ai osului. Multe studii şi produse existente pe piaţă privesc substituenţii osoşi alcătuiţi după principii biomimetice din biomateriale naturale, biomateriale naturale modificate chimic, biomateriale sintetice sau / şi amestecuri compozite.

Biomineralele probează forme şi compoziţii neîntâlnite în calcitele şi aragonitele nebiogene. Astfel, coralii, cochiliile moluştelor şi coaja de ou sunt biocompozite, biomineralizate după modele distincte, compuse din carbonat de calciu asociat unei matrici organice.

Compozitele biomimetice destinate reconstrucţiei osoase trebuie să asigure, din punct de vedere mecanic, suport pe timpul refacerii ţesutului nativ, mimând rolul matricei extracelulare şi să conţină şi componenta celulară, atât de necesară reconstrucţiei.

Coralul natural este un potenţial substituent util pentru grefarea osului, fiind compus din 97 % carbonat de calciu, în formă de aragonit, iar structural,

Scanned with OKEN Scanner

fiind asemănător cu osul spongios. Coralul este un biocompozit total biocompatibil, fără risc de transmitere a bolilor infecţioase, structura sa geometrică unică contribuind la resorbţia rapidă a implantului. Printr-o prelucrare adecvată, se poate transforma superficial carbonatul de calciu în fosfat tricalcic, cu menţinerea formei cristaline tridimensionale.

Din consideraţii biomimetice, se utilizează şi matricea osoasă demineralizată, care este un schelet colagenic tridimensional ce se poate obţine prin demineralizarea oaselor de bovine [107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118]. După liofilizare şi sterilizare, aceasta poate fi utilizată în inducerea osteogenezei. Are efect chemotactic asupra celulelor suşă mezen-chimale, a fibroblaştilor şi a trombocitelor care aderă la reţeaua colagenică, determinând formarea de complexe proteice cu citokine (fibronectină, osteocalcin), factori de creştere care induc diferenţierea condroblaştilor în condrocite şi secreţia matricei cartilaginoase care, apoi, prin vascularizare, diferenţierea osteoblaştilor şi calcificare, determină formarea osului în lungul fibrelor de colagen.

Se cunoaşte faptul că la suporturile 3D, compoziţia, proprietăţile fizico-mecanice, mărimea şi forma porilor, porozitatea, suprafaţa lor specifică, rigiditatea şi biodegradabilitatea influenţează semnificativ funcţiile celulelor.

De aceea, pentru a mima ţesutul osos natural, diverselor matrici biopolimerice li s-au adăugat compuşi cristalini similari hidroxiapatitei biologice, rezultând compozite bio–organice mineralizate. S-a evidenţiat faptul că hidroxiapatita, la scară nanometrică, se leagă iniţial pe striaţiile de perioadă ale colagenului nativ (64 nm), cristalele cresc apoi de-a lungul suprafeţelor fibrilelor şi pot fi evidenţiate analitic. Colagenul mineralizat intra- şi extrafibrilar, prin procesul de nucleacţie a nanocristalelor de hidroxiapatită, se comportă ca un material compozit inteligent şi se poate obţine prin autoasamblare la temperatură ambientală (Fig. 1.21.).

Ceea ce nu este încă elucidat este modalitatea naturală de control al formei şi al orientării cristalelor în procesul de biomineralizare. În aceste procese, macromolecule, cum sunt proteinele, glicoproteinele şi polizaharidele sunt folosite pentru a controla nucleaţia şi creşterea fazelor minerale.

Literatura de specialitate evidenţiază şi testări ale unor materiale compozite biomimetice pentru regenerare osoasă a căror matrici biopolimerice sunt constituite din colagen de tip I şi glicozaminoglicani, chitină, gelatină, hidrogel de celuloză bacteriană, polietilentereftalat, poliamide, biomateriale ceramice, precum şi teste de cristalizare biomimetică a fosfaţilor de calciu în modele organice Langmuir Blodgett [119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131].

Scanned with OKEN Scanner

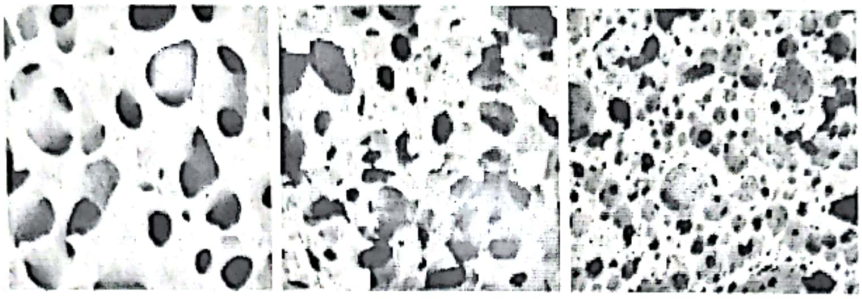


Fig. 1.21. Structuri ceramice pentru substituție osoasă [132]

Acidul hialuronic apare, de asemenea, ca un material formator de matrici 3D suport pentru osteoblaste la substituția osoasă, alături de colagen şi condroitin suflat. Biocompozitele absorbabile, care mimează *in vivo* structura osului uman, sunt utilizate pentru regenerarea fracturilor osoase, a fuziunilor spinale şi în pierderile osoase cauzate de traumatisme, boli sau intervenții chirurgicale. Nu este necesar ca grefa să înlocuiască osul lipsă, ci să încurajeze osteointegrarea, acționând spre regenerarea şi creşterea osoasă ghidată, ajutând organismul să repare materia osoasă pierdută.

Prin investigarea şi copierea mecanismelor de control a reparării osului în mediul biologic local vizat, specialiştii dezvoltă materiale osteoinductive care stimulează regenerarea osoasă, contribuind la îmbunătățirea calității vieții, prin noi terapii ce au la bază biomateriale biomimetice viabile. Se punea întrebarea dacă omul va fi capabil să cultive în bioreactoare propriul țesut osos, în scopul obținerii de grefe autologe în cantități nelimitate. Prin interdisciplinaritate, astăzi, bionica, genomica, proteomica şi nanotehnologiile fac posibil răspunsul pozitiv la această întrebare. Şi chirurgia îşi propune căi minimum invazive, apelând la metodologii bazate pe terapie genetică, pe sisteme cu eliberarea țintită, care să determine local intensificarea osteogenezei *in vivo*, când pacientul însuşi acționează ca un bioreactor.

Succesul unui implant dentar depinde de ancorarea puternică a acestuia în țesutul osos, spre a rezista ciclurilor continui de încărcare–descărcare din timpul masticației. Răspunsul pozitiv al celulelor, creşterea osului pe suprafața implantului şi consolidarea lui în țesut depinde de tehnica de implantare, de topografia şi de biochimia suprafețelor. S-a constatat că, de exemplu, osteoblastele preferă suprafețele rugoase, în timp ce fibroblastele se dezvoltă mai bine pe suprafețele netede [133].

În cazul multor biomateriale ceramice, metalice şi polimerice de sinteză, interfața cu țesutul gazdă trebuie „intermediată" biomimetic [134, 135].

Scanned with OKEN Scanner

O manieră de modificare a suprafeţelor pentru susţinerea adeziunii celulare este imobilizarea unor peptide prezente în matricea extracelulară. Cea mai investigată secvenţă peptidică, derivată din fibronectină, este arginină-glicină-acid aspartic, fiind recunoscută de majoritatea integrinelor [136].

Suprafeţele metalice trebuie modificate la scară nanometrică, pentru a accentua adeziunea şi proliferarea celulară. Titanul şi aliajele sale sunt biomateriale utilizate datorită rezistenţei şi elasticităţii mecanice, a inerţiei chimice *in vivo* şi a biocompatibilităţii, deşi nu se pot lega direct de os. S-au făcut studii pentru modificarea substraturilor de titan pentru osteocompatibilizare, prin depunerea biomimetică de hidroxiapatită în condiţii ambientale, în mediu de ser fiziologic sintetic [137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144].

Ţesuturile conjunctive, din punct de vedere morfologic, se caracterizează prin varietatea elementelor constitutive care sunt reprezentate prin celule conjunctive, fibre colagenice, fibre elastice, fibre de reticulină, substanţă interfibrilară, vase sanguine, nervi etc. Substanţa interfibrilară este gelatinoasă şi elastică în dermă şi hipodermă, dură şi elastică în cartilaje şi tendoane sau dură şi pietroasă în ţesutul osos.

Medicina regenerativă are în vedere repararea ţesuturilor conjunctive după principii biomimetice, utilizând reţele de biopolimeri (de exemplu, elastină şi colagen de tip I) şi celule, de exemplu, condrocite sau celule stem etc.

Dezvoltarea spectaculoasă a chirurgiei plastice, necesitatea tratării arsurilor, au impulsionat studiile privind aspectul suprafeţei pielii şi regenerarea acesteia cu materiale şi prin metode biomimetice.

Pielea este un biocompozit cu o structură complexă, alcătuită din trei părţi fundamentale, deosebite prin gradul de dezvoltare, structură histologică, compoziţie şi scopuri fiziologice: epidermul, dermul şi hipodermul. Pielea umană reprezintă cam a douăsprezecea parte din greutatea corpului, iar aria suprafeţei sale aparente, la omul adult, exceptând cutele majore, este de 1,2 – 2,0 m^2. Dermul reprezintă circa 80 % din grosimea totală a pielii şi este limitată de epiderm la partea superioară, fiind despărţită de aceasta prin membrana bazală, numită membrana vitroasă sau hialină, iar la partea inferioară, este limitată de hipoderm.

Funcţiile pielii ca: protecţie termică, la frecare, presiune şi substanţe nocive, la germeni, împotriva pierderilor de apă şi substanţă biologică; absorbţia substanţelor biologic active; regulator termic; organ secretor şi excretor; senzor complex tactil, de presiune, vibraţii, temperatură şi durere îi determină structura anatomică, care este pronunţat variabilă în diferitele sale regiuni topografice şi, mai ales, dependentă de specia animală, de condiţiile de viaţă şi de mediu.

Scanned with OKEN Scanner

Vindecarea tegumentului distrus poate fi realizată prin următoarele trei soluţii: regenerarea (restabilirea stării iniţiale); repararea (formarea de cicatrici); vindecarea parţială (cronicizarea rănii). De exemplu, în cazul arsurilor termochimice de gradul trei, rănile nu răspund efectiv la tratamentele clasice, tind spre a se croniciza fiind absolut necesară înlocuirea ţesutului lezat.

În acelaşi timp, grefele autologe şi alogrefele nu sunt adesea disponibile în cantitatea necesară, făcându-se apel la produsele viabile ale ingineriei tisulare, culturi celulare pe suporturi 3D (biocompatibile, bioresorbabile, biostabile geometric, sterilizabile), biomimetice structural (de exemplu, biotextile tricotate, ţesute sau neţesute) şi chiar compoziţional (colagen de tip I care prezintă secvenţe de arginină-glicină-acid aspartic, cu afinitate pentru fibroblaste, elastină, factori de creştere) (Tabelul 1.1., Fig. 1.22.).

Tabelul 1.1

Răspunsuri celulare mediate de factori de creştere

	FCE	FCF	FCT	FCEV	FTCB	FCTC
Activitatea fibroblastelor	+	+	+		+	+
Proliferarea cheratinocitelor	+	+			–	
Angiogeneză	+	+	+	+	– sau +	
Formarea matricei extracelulare		+	+		+	+
Chemotaxis	+	+	+		+	
Morfogeneză	+	+			+	

unde:
FCE – factor de creştere al epidermei;
FCF – factor de creştere al fibroblastelor;
FCT – factor de creştere al trombocitelor;
FCEV – factor de creştere endotelial vascular;
FTCB – factor transformator de creştere β;
FCTC – factor de creştere a ţesutului conjunctiv.

Alături de colagen, biotextilele destinate ingineriei tisulare pot conţine fibre de fibroină, alginaţi, chitosan, acizii polilactic şi poliglicolic şi copolimerii acestora, acid polihialuronic etc. şi componente celulare.

În „Journal of Burn Care & Rehabilitation", o statistică a anilor 1992 arată că anual, numai în SUA, au fost raportate 1,2 milioane de persoane cu arsuri dermice, dintre care au fost trataţi peste 650 000 de pacienţi, cca 75 000 fiind spitalizaţi, dintre care un număr de 20 000 cu arsuri grave. S-au înregistrat între 8 000 – 12 000 de decese din această cauză.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 1.22. Imagine SEM a unei structuri 3D de acid hialuronic cu fibroblaste □

Încercări de a substitui pielea arsă prin transplant epidermic au fost făcute de Reverdin şi Thiersch încă din a doua jumătate a secolului al XIX-lea, dar mimarea structurii dermului în substituenţi artificiali, ca substraturi 3D celularizate, s-a făcut doar în ultimul sfert de secol. În anul 1966, M.A. Karasek a realizat culturi de keratinocite *in vitro*, tehnici perfecţionate în 1975 de J.G. Rheinwald şi H. Green. Preocupările biomimetice ale lui I.V. Zannas şi J.F. Burke au condus la obţinerea unui sistem bilaminat colagen-glicozamino-glicani, suport de cultură pentru celulele epidermice [145, 146].

În anul 1981, E. Bell a obţinut primul echivalent al pielii vii, un gel colagenic cultivat cu keratinocite, substituentul permanent numit Integra® [147]. Nu au încetat să apară noi produse mai performante, biomimetice.

Controitin-6-sulfatul şi acidul hialuronic au fost încorporate într-o membrană de gelatină, pentru a crea un micromediu potrivit proliferării, diferenţierii şi migrării celulare. Dublul strat prezintă pori de 150 μm pe partea dinspre carne, mimând ţesutul dermic şi pori de 20 – 50 μm pe partea dinspre exterior, cultivată cu keratinocite, mimând epidermul [148].

Suporturile biomimetice 3D trebuie să faciliteze revascularizarea şi integrarea în ţesutul gazdă. Sunt produse din biomateriale biomimetice, căutându-se şi căile biomimetice de obţinere a acestor structuri [149].

În organismul uman, nanofibrele de colagen şi de elastină există în diferite structuri complexe, constituind structura fundamentală a ţesuturilor, motiv pentru care s-a căutat obţinerea de structuri supramoleculare fibroase pe căi biomimetice, prin autoasamblare şi prin unele tehnologii inginereşti (vezi cap. 12): s-au obţinut fire, prin filarea unor soluţii concentrate colagenice, urmată de parcurgerea, în submersie, a unor băi de coagulare conţinând soluţii saline acide, sulfat de amoniu, acid acetic sau acetonă şi etanol pentru deshidratare. Prin aceste procese se induc, din păcate, modificări conformaţionale însemnate ale proteinei native, iar diametrul fibrelor obţinute, de peste 100 μm, este mult mai mare decât cel al fibrelor din ţesuturile native.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica electrofilării constituie cea mai recentă tehnologie de obţinere a unor structuri fibrilare la scară nanometrică, venind în întâmpinarea conceptelor biomimetice de implementare a ingineriei tisulare. Prin această metodă avansată, se obţin nanofibre infinit lungi, continui, cu diametre de la câţiva microni la 100 nm, formând suporturi 3D pentru culturi celulare, similare matricei extracelulare, în care fibrilele colagenice au diametre cuprinse între 20 nm şi 40 μm (Fig. 1.23).

Se supun acestei tehnici biopolimeri, polimeri sintetici biodegradabili [150] şi substanţe anorganice [151]. Electrofilarea s-a efectuat cu soluţii de colagen de tip I şi III de diferite proveniențe [152], cu soluţii de α şi κ elastină, tropoelastină şi de elastină recombinantă [153] şi amestecuri ale acestora, optimizându-se mereu forma şi diametrul filamentelor, pentru a mima cât mai precis matricea extracelulară. S-a confirmat faptul că suporturile 3D proteice electrofilate suportă adeziunea şi amplifică creşterea celulară.

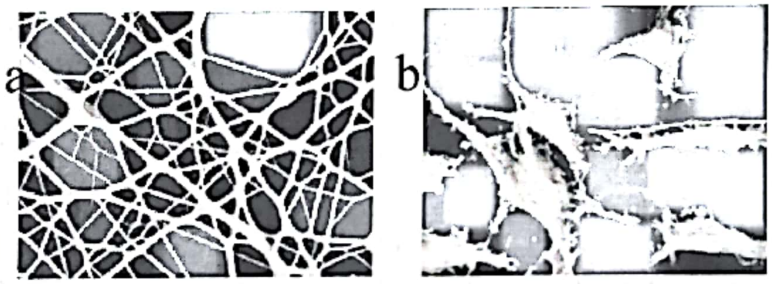


Fig. 1.23. Imagini SEM ale unor structuri 3D – colagenice (a) şi elastinice cu fibroblaste (b) – electrofilate

S-au obţinut diverse suporturi elastinice electrofilate, cu aplicaţii biomedicale, având proprietăţi mecanice diferite prin modificarea structurii 3D, a diametrelor filamentelor (< 1 μm), respectiv a porozităţii. Creşterea elasticităţii structurii, după principii biomimetice, a rezultat prin diminuarea grosimii şi prin mărirea numărului filamentelor.

Tehnologia proteinelor recombinante conduce la polimeri biomimetici cu aplicaţii biomedicale. Strategiile ingineriei genetice oferă posibilitatea ajustării proprietăţilor macroscopice ale polimerilor, după necesităţi, încă de la nivel molecular, construindu-se polipeptide care mimează proteinele naturale, ca rezistenţă mecanică, elasticitate, vâscozitate, stabilitate *in vivo*, precum şi răspunsul gazdei la implantare.

Scanned with OKEN Scanner

În ţările dezvoltate, la începutul ultimului secol, cauza a peste 50 % dintre decesele umane o constituie bolile cardiovasculare. Se estimează că până în anul 2020, aceste boli vor fi răspunzătoare pentru moartea a aproximativ 25 de milioane de oameni anual. Cele mai frecvente şi mai grave îmbolnăviri sunt legate de ateroscleroză, boală caracterizată prin acumularea de lipide extracelulare la nivel subintimal, de ţesut fibros, celule musculare netede şi de calciu.

Cunoaşterea detaliată a proprietăţilor biomecanice ale pereţilor arteriali este crucială pentru înţelegerea schimbărilor ce se produc la nivelul sistemului cardiovascular, din cauza avansării în vârstă, a aterosclerozei şi a hipertensiunii. Ca alternativă a auto- şi alografelor în tratarea patologiilor arterelor şi a venelor cu diametru mare (> 6 mm) este folosirea grefelor vasculare sintetice din fire–fibre tricotate sau ţesute, velurate, de politetrafluoretilenă expandată (Teflon), polietilentereftalat (Dacron), polimeri hidrofobi înalt cristalini, poliuretani (Vascugraft), policarbonaţi (Corvita) etc. Materialele ţesute din Dacron prezintă o mult prea mare porozitate, motiv pentru care s-a încercat obturarea cu colagen, gelatină sau albumină, simple sau reticulate cu aldehidă glutarică sau formică, iar suprafaţa interioară a lumenului a fost heparinizată pentru a împiedica – încetini procesele de formare a trombilor [154, 155]. Suprafaţa interioară încărcată electronegativ a grefelor din Teflon, polimer hidrofob poros, cu pori interconectaţi (10–90 μm în diametru), a fost impregnată cu carbon sau heparinizată (Fig. 1.24.).

Porozitatea teflonului poate fi fructificată ca loc de depozitare de plasmid ADN, care îmbunătăţeşte *in vivo* endotelizarea. S-au făcut studii de depunere de celule endoteliale pe grefele sintetice pentru a reduce trombogenicitatea interfeţelor cu sângele [156, 157, 158].

Din considerente biomimetice, în grefele sintetice, au fost încorporate substanţe bioactive pentru accelerarea procesului de vindecare (fibrină, factori de creştere, heparină). Până acum, materialele sintetice nu au atins eficienţa ţesuturilor native, mai ales în aplicaţiile clinice, la diametre mici ale vaselor.

Proprietăţile elastice ale ţesutului arterial parietal joacă un rol hotărâtor în atingerea performanţelor normale ale sistemului cardiovascular. De aceea, complianţa peretelui arterial este un fenomen esenţial în propagarea pulsului presiunii generate de pompa cardiacă, la nivelul regiunilor periferice.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 1.24. Suprafaţa internă a unei grefe vasculare sintetice.
Ţesătură (a); Tricot (b); Velur (c)

Materialele biologice nu sunt, însă, nici omogene şi nici izotrope.

De aceea, soluţionarea biomimetică a acestor probleme impune, în primul rând, observarea structurii vaselor de sânge, a celor trei straturi din care este constituit ţesutul vascular şi a proprietăţilor lor specifice:

a. Intima, stratul profund al vasului, reprezintă interfaţa sânge–vas. Este formată din celule endoteliale dispuse în monostrat, aşezate pe ţesut conjunctiv. Integritatea intimei este critică, deoarece lezarea duce la ateroscleroză sau coagulare. În artere, un strat continuu de ţesut elastic, numit limitanta elastică internă, formează graniţa dintre intimă şi media.

b. Media, stratul din mijloc al vasului, este proporţională cu diametrul total al acestuia. Media arterelor este, de obicei, mai groasă decât media venelor de acelaşi diametru şi este alcătuită din celule musculare şi ţesut elastic în proporţii variabile. Fibrele musculare netede sunt aranjate circumferenţial, astfel încât planul de secţiune al unei artere poate fi dedus după orientarea / forma nucleilor fibrelor musculare netede.

c. Adventicea, stratul extern al vasului, constituit din fibroblaste în ţesut conjunctiv fibros, care se împleteşte cu ţesutul conjunctiv stromal al organului în care se găseşte vasul de sânge.

Grefa vasculară ideală trebuie să mimeze cât mai profund proprietăţile distincte ale fiecărui strat în parte.

Pereţii vasculari sunt constituiţi din elastină, colagen şi fibre musculare netede, în proporţii variabile, având o densitate cuprinsă între 1 – 1,2 g/cm^3. Fibrele componente au elasticităţi diferite: modulul lui Young al fibrelor elastinice este de ordinul $3 \cdot 10^5$N/m^2, respectiv de $3 \cdot 10^8$ N/m^2 şi $6 \cdot 10^3$–$6 \cdot 10^6$N/m^2, pentru cele colagenice şi musculare. S-a constatat că celulele muşchilor netezi vasculari sunt contractile, migratoare şi proliferative, iar fibroblastele adventicei pot fi stimulate să devină miofibroblaste [159]. Peretele arterial manifestă un comportament anizotrop, având constante elastice variabile în

Scanned with OKEN Scanner

direcţiile radială, circumferenţială şi axială, fiind necesară identificarea unui număr mare de constante de material pentru relaţiile constitutive [160, 161].

Colagenul de tip I, componentă importantă a majorităţii ţesuturilor conjunctive, este prezent şi în pereţii vasculari. Datorită secvenţelor din structura triplului helix care leagă integrinele, matricile colagenice înlesnesc adeziunea şi creşterea celulară.

Pentru prima dată, în anul 1986, C.B. Weinberg şi A. Bell au descris modalitatea de obţinere *in vitro* a unei grefe viabile pe matrici colagenice 3D [162]. Din păcate, suporturilor 3D alcătuite din proteine fibroase reconstituite le lipseşte rezistenţa la solicitări mecanice şi *in vivo*, fiind susceptibile de a fi rapid biodegradate.

Pentru îmbunătăţirea rezistenţei mecanice a structurilor artificiale colagenice, s-a recurs la tehnici biomimetice de reconstituire din soluţie şi la stimularea fibroblastelor în biosinteza fibrelor structurate ierarhizat [163]. Compozitele colagen–elastină au probat rezistenţe mecanice adecvate [164].

Progresele făcute de ingineria tisulară cardiovasculară şi reconsiderarea biomietică a proiectării protezelor a condus la implementarea de grefe viabile, care mimează proprietăţile native ale vaselor de sânge. Acestea sunt replici artificiale formate din două straturi, suporturi 3D pe schelet colagenic de tip I, mimând intima şi media, prezentând culturi de celule specifice (celule musculare şi fibroblaste), preluate prin biopsie de la vase de sânge native. După proliferarea şi diferenţierea celulară *in vitro*, straturile sunt asamblate după modelul nativ, iar înainte de implantare, se însămânţează cu celule endoteliale.

Fibroblastele dermice au fost menţinute în condiţiile specifice dezvoltării matricei proteice extracelulare, în tehnologia tisulară bazată pe foi sau filme 3D. După 6 săptămâni, foile proteice fibroase au fost desprinse de substratul de cultură şi rulate temporar pe un suport cilindric inert unde, după o perioadă de maturare de circa 10 săptămâni, straturile individuale suprapuse fuzionează într-un singur ţesut omogen. Cu câteva zile înainte de implantare, vasul bioartificial este însămânţat cu celule endoteliale autologe [165]. Acest proces poate fi repetat pentru a produce, după principii biomimetice, vase de sânge bioartificiale multistrat rezistente până la presiuni de 3 000 mm Hg.

În scopul obţinerii de suporturi biomimetice 3D, cât mai asemănătoare fiziologic cu vasele de sânge native, s-au testat ţesuturi alogene decelularizate ca substituenţi ai matricii extracelulare. Au fost testate suporturi celulare alcătuite din intestin de porc decelularizat, cu depunerea în lumen de colagen reticulat bovin de tip I [166]. Ţesutul alogen arterial pulmonar decelularizat prin metoda enzimă / detergent a probat reale proprietăţi reparatorii

Scanned with OKEN Scanner

pe vasele mari la ovine [167]. Reducerea trombogenicităţii suporturilor 3D decelularizate s-a realizat prin heparinizarea covalentă a lumenului. Grefele decelularizate heparinizate care au probat proprietăţi similare vaselor proaspete, rezistând la până de zece ori presiunii fitiologice sanguine şi implantate pe artere carotide la câini, au fost recelularizate în timp de două luni atât cu celule musculare, cât şi cu celule endoteliele [168]. Alo- şi xenografele decelularizate au fost recelularizate *in vitro* cu celule musculare netede vasculare umane [169].

Celulele musculare netede şi cele endoteliale au migrat şi s-au diferenţiat pe ţesuturi vasculare porcine decelularizate, cultivate împreună cu celule endoteliale progenitoare A20, rezultând ţesuturi vasculare transgenice cu potenţial anti-arterosclerotic şi anti-stenotic [170]. Dacă fibrele de colagen asigură rezistenţa, rigiditatea matricei extracelulare, fibrele de elastină organizate direcţional specific asigură extensibilitatea şi rezilienţa ţesutului [171].

Prin electrofilarea unor amestecuri de soluţii de colagen de tip I, elastină şi acid polilactic sau copolimeri ai acizilor polilactic şi poliglicolic, poli (ε-caprolactona), gelatină de tip A sau B, s-au obţinut matrici 3D cu proprietăţi similare arterelor de bovine, rezistând la presiuni cu de 12 ori mai mari decât presiunea normală sistolică [172, 173, 174]. Meşele biomimetice folosite în experimentele elastografice vasculare sunt compozite de agar şi gelatină, unde gelatina contribuie la caracterul elastic al materialului rezultat, în timp ce agarul asigură rigiditatea şi coeziunea [175].

Sistemul nervos prezintă câteva provocări unice pentru aplicaţiile biomimetice. Nervii periferici se regenerează în urma unor traume, dar rezultatele tratamentelor clinice sunt limitate în prezent din punct de vedere al recuperării, iar nervii centrali dezvoltă ţesuturi cicatriciale, care inhibă regenerarea (Fig. 1.25.).

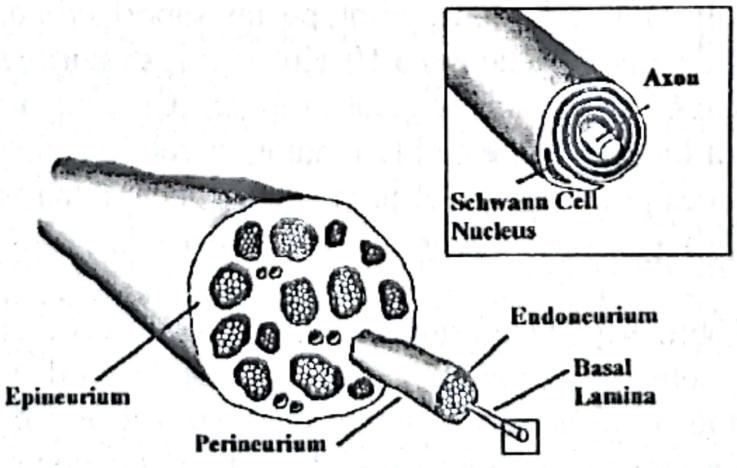


Fig. 1.25. Anatomia nervului periferic

Scanned with OKEN Scanner

Epineureum leagă fasciculele nervoase de componentele vecine, inclusiv de vasele sanguine, fiecare fascicul este înconjurat de perineureum, alcătuit din fibre de colagen şi celule plate (ex. fibroblaste). În interiorul fasciculelor, ţesutul conjunctiv, endoneureum, conectează axonii individuali. Endoneureumul constă din fibre de colagen orientate paralel cu axonii. Stratul bazal separă axonii de endoneureum şi asigură situsuri pentru ataşarea axonilor. Stratul bazal este compus din laminină, colagen şi alte componente ale matricii extracelulare. Sub membrana bazală, celulele Schwann înconjoară axonii, izolându-i. Pliurile membranei celulare Schwann ce înconjoară axonii şi proteinele din interior sunt cunoscute sub numele de *mielina*.

Există o nevoie clară de dispozitive biomimetice pentru sistemul nervos. Principalul obiectiv al biomimeticii la nivelul sistemului nervos este de a stimula regenerarea sau de a reda funcţia după lezarea nervoasă.

Capacitatea limitată de recuperare a sistemului nervos şi necesitatea stringentă a înlocuirii funcţiei nervoase a condus la proiectarea şi apariţia unor dispozitive biomimetice de protezare. Majoritatea tehnologiilor utilizează microelectrozi pentru a interacţiona direct cu celulele nervoase (de exemplu, implanturile retinal şi cohlear). Aceste accesorizări digitale nu se aseamănă, însă, suficient cu semnalizarea nervoasă, motiv pentru care protetica viitorului va utiliza analogii de o mai mare acurateţe. Multe rezultate ştiinţifice de certă valoare, care au potenţialul de a contribui la o mai bună înţelegere a sistemelor vii, la dezvoltarea unui nou tip de medicină regenerativă, inclusiv ingineria neuromorfică, la formularea unor biotehnologii revoluţionare, la sinteza unor medicamente eficiente şi la administrarea lor selectivă către ţintele dorite, întârzie, din păcate, să devină practică curentă. Există preocupări constante, pe baza unor principii biomimetice, pentru proiectarea–dezvoltarea unor sisteme care să imite structura nervului şi să stimuleze regenerarea acestuia atât în sistemul nervos periferic, cât şi în cel central. Aceste dispozitive încorporează semnale biologice, mecanice, chimice şi electrice, pentru a mima cât mai precis mediul nervos natural. Dispozitivele de regenerare şi de protezare vin în întâmpinarea unora dintre aceste nevoi [176].

S-au înregistrat succese la recuperarea traumelor minore ale sistemului nervos periferic unde recuperarea funcţională pe cale clinică a reabilitat 80 % dintre cazuri, dar nu şi la nivelul sistemului nervos central. Viteza mică de regenerare necesită perioade îndelungate pentru reabilitare şi recuperare.

Reconstrucţia tisulară ghidată a nervilor periferici, care utilizează biopolimeri (colagen, fibrină, glicozaminoglicani) şi polimeri biodegradabili (acizi polilactic şi poliglicolic), autografe neuronale şi celule Schwann,

Scanned with OKEN Scanner

recurge şi ea la principii biomimetice, funcţionând şi ca un sistem de eliberare controlată, care grăbeşte regenerarea axonală [177, 178].

Canalele de ghidare nervoasă asigură conducerea mecanică pentru axoni în procesul de regenerare şi pot prezenta compartimente fasciculare (mimând natura fasciculară a nervului), substraturi 3D de tipul matricii extracelulare, funcţionalizate cu celule sau cu neurotrofine (proteine care stimulează regenerarea nervoasă) cu eliberare controlată [179] şi care pot fi modificate pentru a stimula proprietăţi, cum ar fi: conductivitatea electrică [180] sau biodegradabilitatea şi porozitatea [181, 182] (Fig. 1.26.).

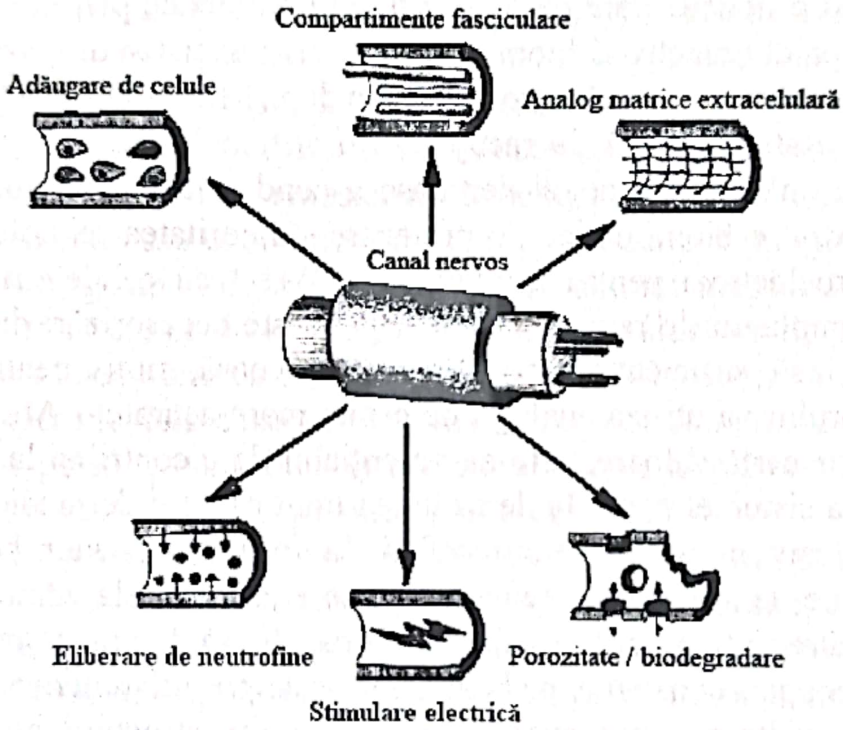


Fig. 1.26. Canale de ghidare nervoase
şi modificări de stimulare a regenerării

Au fost testate şi canale combinate, umplute cu fibre de colagen de tip I, conţinând factori neurotrofici şi molecule anti-inhibitorii, acoperite cu laminină şi fibronectină, care grăbesc creşterea neuritelor [183, 184]. Porozitatea gelurilor (de exemplu, Matrigel: laminină, colagen, elastină şi sulfat de heparan) este un factor critic pentru extensia nervoasă. Organismul uman răspunde la diverse tipuri de semnale, motiv pentru care sunt necesare tehnici complexe de mimare biologică care pot aproxima procesul natural de regenerare.

Biomimetica funcţiei spinale a început cu dezvoltarea de microelectrozi matriţaţi pe substrat. Microelectrozii de regenerare, pot „citi“ modi-

Scanned with OKEN Scanner

ficările apărute în potenţialul de membrană al axonilor, utilizează cipuri perforate pentru a interacţiona cu fibrele nervoase în procesul de regenerare. Un alt dispozitiv protetic biomimetic conceput pentru a interacţiona cu celula nervoasă utilizează, în locul microelectrozilor, tranzistorii cu efect de câmp de mărime micrometrică. Una din cele mai mari dificultăţi asociate protezelor neurale biomimetice este integrarea şi interpretarea semnalelor neurale [185].

Şi exemplele de utilizare biomimetică a bioplimerilor ar putea continua şi pentru cartilaje, tendoane, ligamente, muşchi ş.a.m.d.

Procesele de cultivare a ţesuturilor viabile umane (piele, vase de sânge, cartilaj) în bioreactoare respectă principiile biomimeticii.

Acum 50 de ani, s-a efectuat primul transplant de rinichi uman, deschizându-se calea înlocuirii unor părţi uzate sau vătămate ale organismului. Astăzi, pentru că cererea de transplanturi de ţesuturi şi de organe depăşeşte cu mult oferta, crearea de organe viabile în laborator constituie o provocare importantă pentru medicină, bioinginerie protetică şi ştiinţele conexe [186].

Organele bioartificiale (rinichi, pancreas, ficat, plămâni etc.) combină aspectele caracteristice protezelor implantabile cu avantajele biologice ale transplantului de organe şi constituie o alternativă a terapiei genetice [187, 188, 189, 190].

Aparatele extracorporale cum ar fi: aparate de circulaţie extracorporală, aparate de hemodializă, ficatul artificial, bypass-uri cardio-pulmonare, oxigenatoare cu membrană, mimează funcţii ale organelor vitale.

Mai multe tipuri de ficat bioartificial se află în teste clinice [191].

În proiectarea acestor aparate, precum şi a sistemelor de eliberare controlată sau ţintită a principiilor active, se ţine seama de natura calitativă a fenomenelor de transport de masă, de moment şi de energie din mediile biologice şi de termodinamica şi cinetica reacţiilor chimice şi biochimice. Se studiază posibilităţile de mimare în scopuri medicale a fenomenelor de transport: transportul de masă transmembranar şi prin medii poroase, transportul transvascular, implicaţiile interacţiunilor biochimice în transportul de masă, transportul inter-celular şi adeziunea celulară, transportul de masă prin matricea extracelulară, transportul de gaze între sânge şi ţesuturi, transportul în organe etc.

Suprafeţele polimerice care vin în contact cu fluidele biologice, cu celulele sau cu componentele celulare pot fi construite spre a proba proprietăţi specifice de recunoaştere ori, dimpotrivă, de a rezista legării unor componente, în funcţie de scopul urmărit şi de mediul biologic. Designul suprafeţelor pentru recunoaştere şi adeziune celulară sau pentru pasivizare cuprinde un număr de tehnici, cum ar fi: grefarea suprafeţelor, iradierea în

Scanned with OKEN Scanner

ultraviolet, iradierea cu radiaţii ionizante sau iradierea cu fascicule de electroni.

A fost pusă la punct o nouă tehnică, numită *biomimetică configuraţională*, prin care se pot obţine noi materiale biomimetice care imită recunoaşterea biologică pentru eliberarea controlată sau ţintită a principiilor active, cu aplicaţii în ingineria cito-tisulară şi în biosezori [192]. Termenul de *biomimetică configuraţională* se referă la un aranjament 3D a unor grupări chimice care pot să lege, în mod specific, anumite biomolecule, similar recunoaşterii moleculare din mediul biologic (de exemplu, enzimă–substrat, ADN – ARN, anticorp–antigen etc.). *In vivo*, recunoaşterea biomoleculară de către structurile macromoleculare implică legături puternice, necovalente, datorate structurilor cu orientări specifice ale unor grupe funcţionale multiple, complementarităţii şi configuraţiei. Mecanismele de recunoaştere biomoleculară alcătuiesc un tot funcţional complex care implică reorganizarea conformaţională şi / sau flexibilitatea moleculară a părţilor implicate.

Biomimetica configuraţională este parte din imprintarea biomimetică configuraţională moleculară (imprinting), o tehnică de obţinere în matricile polimerice a unor modele – cavităţi profilate sau nanovacuole, cu memoria formei moleculelor model, prezentând grupări chimice orientate spre a forma puncte multiple de complexare cu molecule specifice. Tehnica mimează mecanismul enzimatic de recunoaştere cheie – broască şi mână – mănuşă.

Noile terapii inteligente sau eliberarea inteligentă a principiilor active fac apel la cele mai noi generaţii de biomateriale senzitive capabile de recunoaştere moleculară. Reţele biomimetice inteligente, suficient de permisive pentru difuzia solventului şi a solvitului atât în, cât şi din matrice, pot recunoaşte şi lega molecule biologice specifice.

Evoluţia a condus la capacitatea de asamblare naturală a unei largi palete de specii chimice în structuri funcţionale care pot lega, în mod specific, anumite molecule. Arhitecturi biomimetice nanometrice funcţionale, mimând interfeţele celulare, pot fi obţinute prin autoasamblarea lanţurilor proteice naturale sau sintetice alcătuite din mai puţin de 100 de aminoacizi, în special pentru încapsularea şi eliberarea ţintită a unor principii active.

Tehnologia imprintării moleculare biomimetice a creat posibilităţi sporite de încărcare cu principii active a moleculelor de transport pentru sistemele cu eliberare susţinută, pentru obţinerea de biosenzori stabili în noile terapii şi pentru noi dispozitive de diagnostic.

Scanned with OKEN Scanner

Sistemele biomimetice de eliberare a substanţelor bioactive includ un design de recunoaştere a ţintei şi mecanisme inteligente de duplicare a proceselor complexe biologice şi fiziologice, controlează proporţiile dintre concentraţiile unor biomolecule specifice utile, recunosc biomoleculele nedorite şi le înlătură prin mecanisme biocatalitice, asigură eliberarea ţintită a principiilor active şi a proteinelor, susţin procesele concurenţiale alosterice de recunoaştere şi de legare–eliberare a liganzilor. Aceste materiale biomimetice artificiale pot fi incluse în sisteme de eliberare controlată a medicamentelor acţionând atât în eliberarea *in vivo* a principiilor active conţinute, dar şi în fixarea şi transportul unor biomolecule. Se preferă eliberarea medicamentelor anticancer, la locul ţintit de acţiune, prin administrarea intravenoasă a unor preparate obţinute prin încapsularea principiilor active în vezicule unilamelare mari (LUV cu diametre $\Phi < 100$ nm) care probează durate îndelungate de viaţă în circulaţia sistemică.

Reţele biomimetice imprintate molecular şi hidrogeluri biomimetice au fost utilizate ca purtători de medicamente [193, 194, 195]. Aceste structuri sunt suficient de flexibile pentru a permite transportul difuzional, în şi din reţea, atât pentru liganzi, cât şi pentru solvent.

Sinteza şi caracterizarea gelurilor configuraţionale biomimetice, a sistemelor de eliberare a medicamentelor imprintate molecular şi a proteinelor constituie teme de mare interes în cercetarea actuală [196, 197, 198]. Abilitatea de a mima morfologia suprafeţelor sistemelor biologice permite cercetătorilor să reproducă proprietăţile unice ale suprafeţelor asociindu-le, la scară nanometrică, noilor materiale biomimetice [199].

Vaccinurile sunt preparate biologice dotate cu proprietăţi antigenice, care declanşează apariţia răspunsului imun la organismele supuse vaccinării. Asociaţii lipidice supramoleculare, mimând dublul strat lipidic celular, au fost realizate pe diverse specii chimice de particule. Astfel, aplicaţii ale particulelor biomimetice sferice şi discoidale în eliberarea medicamentelor şi a vaccinurilor, a particulelor şi a lipozomilor conjugaţi cu anumiţi liganzi, au probat o capacitate sporită de localizare a „ţintei", respectiv accentuarea asimilării *in vivo*, stimulând un răspuns imunitar mai bun. Încorporarea unor caracteristici biomimetice în vaccinurile microparticulate a dovedit o creştere semnificativă a caracterului efectiv după administrare. Mimarea antigenelor cu anticorpi încapsulaţi a trecut deja pragul unde vaccinurile anti-Id au probat răspunsuri imune protective în modele animale [200].

Harta genomului uman a evidenţiat faptul că, dintre cele peste trei miliarde de baze, doar 2 % sunt folosite pentru crearea organismului, în timp ce 8 % sunt destinate retrovirusurilor endogene, martore a milioane de ani de

Scanned with OKEN Scanner

luptă între organismul invadat şi infecţia virală. Readucerea la viaţă a unor retrovirusuri este o cale biomimetică de a găsi modalităţi de intervenţie împotriva HIV şi a cancerului.

Identificarea şi caracterizarea moleculară a antigenilor tumorali a contribuit la dezvoltarea imunoterapiei tumorale specifice. Peptidele imunodominante, derivate din antigeni tumorali, pot fi uşor sintetizate *in vitro* şi folosite apoi, pentru imunoterapie, atât singure, cât şi în combinaţie cu adjuvanţi: lipide, liposomi sau peptide ajutătoare [201]. Au fost dezvoltate mai multe tipuri de vaccinuri biomimetice anticanceroase: vaccinuri pe bază de celule tumorale, alcătuite din celule vii alogene sau autogene, capacitatea proliferativă a acestora fiind limitată prin: iradiere, cu mitomicina C sau cu agenţi termici; vaccinuri dendritic celulare cu celule dendritice care pot prezenta antigeni tumorali de celule CD4+ şi CD8+ şi sunt utilizate cu succes în imunoterapia melanomului; ADN – vaccinurile implică încorporarea genelor ce codează antigenii tumorali în plasmide sau în vectori virali, care creşte probabilitatea dezvoltării răspunsului imun antitumoral.

Cercetările în domeniul vaccinării antituberculoase urmăresc: izolarea acelor fracţiuni antigenice din *Mycobacterium tuberculosis*, care induc în organism un răspuns imun protector şi includerea acestora, sub formă de copii multiple, în vectori purtători; administrarea de microbacterii saprofite, lipsite de potenţial patogen, preluate din mediul înconjurător; administrarea de vaccinuri plasmidice ADN; administrarea unor vaccinuri preparate din recombinanţi genetici. În principiu, metoda de preparare a recombinanţilor genetici este similară cu aceea de clonare a genelor care codifică anumite proteine. Gena care codifică antigenul dorit este inserată în genomul vectorului, fiind apoi transcrisă şi translată, rezultând antigenul protector dorit, în amestec cu alte proteine [202].

Şi toate acestea sunt tot atâtea exemple de mimare a soluţiilor naturii [203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211].

Majoritatea fosfolipidelor adoptă structuri în dublu strat, în mod spontan, după dispersarea în apă. Lipozomii sunt sisteme unilamelare sau multilamelare, având straturi alternative lipidice şi apoase, cu membrane alcătuite din straturi duble fosfolipidice. Această structură permite încorporarea de substanţe medicamentoase solubile în apă (în compartimentele apoase) şi solubile în lipide (în straturile duble fosfolipidice), având dimensiuni în intervalul 0,02 – 100 μm. Lipozomii sunt utilizaţi ca sisteme de eliberare controlată netoxice, biodegradabile şi neimunologice care pot solubiliza medicamente cu solubilitate scăzută în apă. Micelele hidrofile ale unor polimeri amfifili, al căror miez lipofil solubilizează medicamentele hidrofobe, sunt

Scanned with OKEN Scanner

folosite drept agenţi purtători de medicamente, cu aplicaţii în eliberarea controlată şi ţintită a principiilor active, formând sisteme solubile în apă. Având dimensiuni mici, micelele sunt extravazate la ţintele tumorale, datorită permeabilităţii mărite a vaselor de sânge din aceste zone sau pot evita excretarea renală, iar recunoaşterea de către sistemul reticuloendotelial scade substanţial pentru diametrele micelare mai mici de 200 nm. Se consideră că aceste sisteme obţinute prin sinteză reprezintă o nouă chimioterapie a cancerului, care foloseşte procesele celulare în locul celor moleculare, atacând celulele maligne în acelaşi mod, ca şi limfocitele T, când acestea recunosc antigenele asociate celulei tumorale [47].

Colesterolul este unul dintre cei mai răspândiţi steroli din regnul animal, jucând roluri importante de regulator al fluidităţii membranei celulare şi în auto-asamblarea moleculelor în sistemele biologice. Autoasamblarea biomimetică, la scară nanometrică, a moleculelor este utilizată astăzi pentru obţinerea unor structuri cu arhitecturi şi orientări specifice. Pentru a combina avantajele lipozomilor cu cele prezentate de către micele polimerice, au fost obţinute noi micele biomimetice, prin autoasamblarea de copolimeri ai colesterolului cu poli(2-metacriloloxietilfosforilcolina) [212, 213].

Multe aplicaţii ale nanoparticulelor şi a microsferelor polimerice desemnează diverse sisteme inteligente de eliberare a principiilor active. Unele metode biomimetice înlesnesc obţinerea şi asamblarea biomaterialelor şi a sistemelor cu precizie moleculară. Se anticipează sisteme de eliberare a medicamentelor, nano- şi micrometrice, cu autoreglare, care vor combina acţiunile de diagnosticare cu cele terapeutice, cu monitorizarea în timp real a ţintelor biologice şi administrarea instantanee a principiilor active conţinute, care vor schimba profund natura şi practica medicinii [214].

Medicina şi farmacologia întâmpină o acută nevoie de sisteme de eliberare transvasculară menite să crească specificitatea eliberării ţintite şi permeaţia tisulară, prin mimarea mecanismelor naturale de transport şi atribuire direcţionată a biomoleculelor. Cunoştinţele despre adresabilitatea biologică şi noile mijloace genomice pot fi aplicate în sisteme biomimetice inteligente de eliberare, caracterul efectiv al ţintirii tisulare fiind atins prin utilizarea leucocitelor, a bacteriilor şi a viruşilor.

Bioîncapsularea conduce la celule încapsulate în membrane semipermeabile, care permit allo- şi xenotransplantarea, fiind protejate faţă de activitatea sistemului imun, fără a fi nevoie de inhibarea acestuia. S-au înregistrat succese în teste preclinice şi clinice de transplant celular pentru diabet, hemofilie, cancer şi afecţiuni renale severe. Insuficienţa celulelor

Scanned with OKEN Scanner

potrivite pentru transplantare, atât cadaverice, cât şi fetale, a condus la utilizarea celulelor stem, ca celule universale pentru încapsulare, cu diferenţierea ulterioară *in vivo* la biosemnalele specifice. Microîncapsularea reprezintă o tehnologie cu un potenţial clinic extrem de ridicat, necesară pentru imunoizolarea celulelor stem, în tratarea unei game largi de afecţiuni [215]. Bioîncapsularea ar putea să dea soluţii de eliminare a utilizării principiilor de imunomodulatoare şi imunosurpresoare, creându-se premize de utilizare a unor noi clase de sisteme de eliberare controlată sau ţintită a substanţelor medicamentoase, atât la nivel local, ţintit, cât şi sistemic (Fig. 1.27).

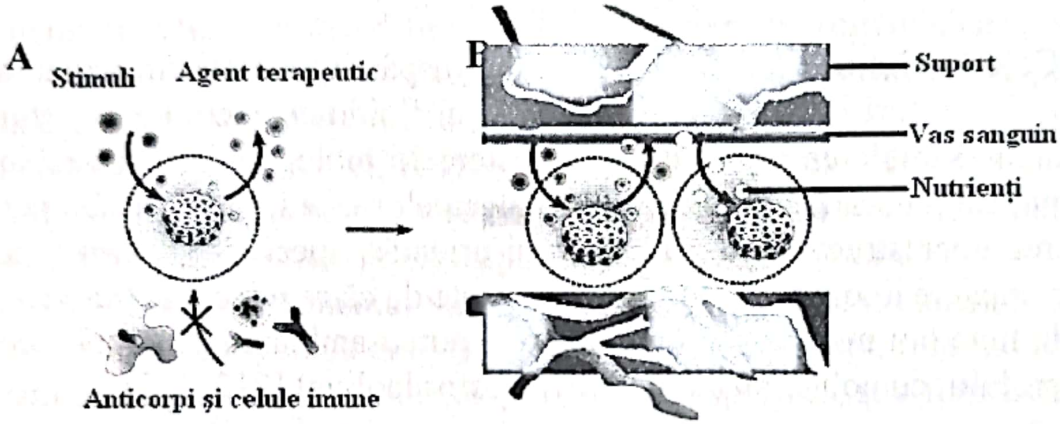


Fig. 1.27. Microîncapsularea celulară.
A. Nutrienţii, oxigenul şi stimulii pot traversa membrana,
în timp ce anticorpii şi celulele imune sunt excluse,
B. Suport solid prevascularizat
care înlesneşte hrănirea celulelor încapsulate [216]

Celulele stem adulte, izolate din măduva spinării, au probat diferenţierea *in vitro* pe diverse suporturi electrofilate, în miocite, condrocite, adipocite, osteoblaste etc. Celulele stem oferă perspectiva unor aplicaţii spectaculoase în terapia celulară şi în medicina regenerativă, datorită capacităţii lor de autoreplicare şi diferenţiere specifică [217].

Nevoia de a fabrica suporturi pentru celule care să mimeze funcţiile biologice şi fizice ale matricii extracelulare native a condus la utilizarea a trei metode principale de obţinere a nanofibrelor polimerice, biopolimerice sau a compozitelor fibrilare: electrofilarea, separarea de fază şi autoasamblarea.

De curând, tehnica de pulverizare electrodinamică, având la bază câmpuri electrice de mare intensitate, a fost testată în procesarea celulelor vii încapsulate, fără afectarea capacităţii lor vitale. Această biotehnologie, folosind biosuspensii celulare ($>10^7$ celule/ml), poate aplica extrem de

Scanned with OKEN Scanner

precis biostraturi specifice pe suporturi artificiale [218]. Rezultate promiţătoare au fost obţinute utilizând suporturi nanometrice 3D din biopolimeri elecrofilaţi: colagene de tip I, II şi X, gelatină, elastină, elastină–colagen, polipeptide elastinice biomimetice, fibrinogen, fibroină, cazeină. Reţelele nanometrice colagenice fibroase au dovedit susţinerea adeziunii, creşterii şi diferenţierii celulelor stem pulverizate electrodinamic, observată la 12 zile, în condiţii de cultură [219].

Celulele încapsulate constituie şi o sursă de citokine şi de factori de creştere, generând sisteme biomimetice multicomponent, sisteme biointeractive, cu diverse aplicaţii în ingineria tisulară.

Teoria soluţionării problemelor inventive (Teoriya Resheniya Izobreatatel-skikh Zadatch – TRIZ) este o ştiinţă, răspândită astăzi în întreaga lume, care priveşte problemele de creativitate aferente fiecărui domeniu al cunoaşterii şi se aplică pentru evidenţierea problemelor şi rezolvarea acestora prin dezvoltarea gândirii inovative şi a personalităţii creatoare. Pentru fiecare individ în parte, acomodarea cu TRIZ are un impact determinant asupra propriei vieţi, ajutând în rezolvarea multor probleme, simplificându-i munca şi activitatea zilnică, transformând tot ceea ce întreprinde în activităţi interesante şi creative. Sfera de interes se lărgeşte, cunoştinţele care se acumulează sunt tot mai profunde, subiecţii privind lumea înconjurătoare mai sistematic analizaţi decât simpla relaţie de cauză şi efect.

TRIZ poate servi la înţelegerea şi transferul de idei şi analogii de la biologie la tehnologia inginerească şi aplicarea acestora pentru îmbunătăţirea calităţii vieţii. BioTRIZ, biomimetica aplicată în această direcţie se conduce după principii aplicate analizei sistemelor. Există astăzi extrem de multe aplicaţii ale biomaterialelor, găsindu-se peste 8 000 conţinute în diverse dispozitive medicale, peste 2 500 de produse de diagnostic şi circa 40 000 de preparate farmaceutice având la bază biomaterialele.

Soluţii la întrebările de astăzi ale medicinii vor veni prin dezvoltarea nanotehnologiilor, prin caracterizarea, organizarea biomimetică şi manipularea materiei la scară moleculară, implicând ştiinţele vieţii şi ştiinţe din domenii conexe: biomimetică, biotehnologii, biomateriale, inginerie cito-tisulară, fenomene de transport biologic, biochimie, biomecanică, biosemnale, bioinformatică, inginerie clinică, inginerii ale reabilitării, robotică medicală, imagistică, senzori şi bioinstrumentaţie, modelare a sistemelor fiziologice etc. Se aşteaptă de la cunoaşterea la scară nanometrică noi soluţii apropiate de subtilitatea naturii, mai simple şi mai eficiente, inspirate din viaţa celulelor vii.

Scanned with OKEN Scanner

Acesta nu este sfârşitul.
Nu este nici măcar începutul sfârşitului.
Dar este poate sfârşitul începutului.

(Winston Churchill, 1942)

Bibliografie:

1. Piehler, H.R., *The Future of Medicine: Biomaterials*, MRS Bulletin, v. 25, no. 8, pp. 67 – 70, 2000

2. Chiriţă, M., *Substituenţi sanguini*, Colecţia Bioinginerie Medicală, nr. 3, Ed. Tehnică-Info, Chişinău, 2001, R.A. Freitas Jr., *Respirocytes: High Performance Artificial Nanotechnology Red Blood Cells*, NanoTechnology Magazine 2:1, 8-13 (11), 1996

3. Chiriţă, M., www.biomateriale.ro, 2007

4. Chiriţă, M., *Biopolimeri şi compozite naturale*, Colecţia Bioinginerie Medicală, nr. 1, Editura Tehnica-Info, Chişinău, 2001

5. Chiriţă, Gh., Chiriţă, M., *Tratat de Chimia şi Tehnologia pieilor şi blănurilor*, vol. 1, Editura Gh. Asachi, Iaşi, 1999

6. Bornstein, P., *Covalent cross-links in collagen: A personal account of their discovery*, Matrix Biology 22: 385–391, 2003

7. Mayer, G. and Sarikaya, M., *Rigid Biological Composite Materials: Structural Examples for Biomimetic Design*, Experimental Mechanics 42: 395–403, 2002

8. Teeri, T.T., Brumer, H., Geoff, D., Gatenholm, P., *Biomimetic engineering of cellulose–based materials*, Trends în Biotechnology, volume 25, Issued 7, pp. 299-306, 2007

9. Kassner, M.E., Nemat-Nasser, S., Suo, Z., Bao, G., Barbour, J.C., Brinson, L.C., Espinosa, H.D., Gao, H.J., Granick, S., Gumbsch, P., Kim, K.S., Knauss W., Kubin, L., Langer, J., Larson, B.C., Mahadevan, L., Majumdar, A., *New Directions in Mechanics*, Mechanics of Materials 37, n. 2 – 3, pp. 231 – 259, 2005

10. Vincent, J., *The Nature of Materials*, Journal of Bionics Engineering, vol. 2, nr. 2, 93–114, 2005

11. Vincent, J., *Selected Natural Materials in History*, Journal of Bionics Engineering, vol. 2, nr. 3, 161 – 176, 2005

12. Autumn, K., Majidi, C., Groff, R. E., Dittmore, A., Fearing, R., *Effective elastic modulus of isolated gecko setal arrays*, The Journal of Experimental Biology 209, 3558-3568 Published by The Company of Biologists 10.1242 / jeb. 02469, 2006

Scanned with OKEN Scanner

13. Autumn, K., Hsieh, S.T., Dudek, D.M., Chen, J., Chitaphan, C., and Full, R.J., *Dynamics of geckos running vertically, J. Exp. Biol.* 209, 260-272, 2006

14. Geisler, B., Dittmore, A., Gallery, B., Stratton, T., Fearing, R., Autumn, K., *Deformation of isolated gecko setal arrays: bending or buckling? 2. Kinetics*. Int. Comp. Biol. 44, 557, 2005

15. Hansen, W. Autumn, K., *Evidence for self-cleaning in gecko setae*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 385 – 389, 2005

16. Gorb, S.N., Beutel, R.G., *Evolution of locomotory attachment pads of hexapods*, Naturwissenschaften 88, pp. 530 – 534, 2001

17. Chung, J.Y., Chaudhury, M.K., *Roles of discontinuities in bio-inspired adhesive pads*, J. R. Soc. Interface 2, pp. 55 – 61, 2005

18. Gorb, S., Varenberg, M., Peressadko, A., Tuma, J., *Biomimetic mushroom – shaped fibrillar adhesive microstructure*, J. R. Soc. Interface 4, pp. 271 – 275, 2007

19. Geim, A.K., Dubonos, S.V., Grigorieva, I.V., Novoselov, K.S., Zhukov, A.A., *Microfabricated adhesive mimicking gecko foot-hair*, Nat. Mater. 2, pp. 461–463, 2003

20. Santos, D., Kim, S., Spenko, M., Parness, A., Cutkosky, M., *Directional adhesive structures for controlled climbing on smooth vertical surfaces*, IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation, pp. 1262 – 1267, Rome Italy, 10 – 14 April 2007

21. Vacanti, J., Langer, R., Karp, J.M., *A biodegradable and biocompatible gecko-inspired tissue adhesive*, Proc. Nat. Acad. Sciences, vol. 105, nr. 7, pp. 2307–2312, 2008

22. Reddy, S., Arzt, E., del Campo, A., *Bioinspired surfaces with switchable adhesion*, Advanced Materials, vol. 19, pp. 3833–3837, 2007

23. Sethi, S., Ge, L., Ci, L., Ajayan, P.M., Dhinojwala, A., *Gecko-inspired carbon nanotube-based self-cleaning adhesives*, Nanoletters, 10.1021/nl0727765, 12 Feb. 2008

24. Yurdumakan, B., Raravikar, N.R., Ajayan, P.M., Dhinojwala, A., *Synthetic gecko foot-hairs from multiwalled carbon nanotubes*, Chem. Commun. 30, pp. 3799–3801, 2005

25. Mahdavi, A., Ferreira, L., Feirrara, L., Sundback, C., Nichol, J.W., Chan, E.P., Carter, D.J.D., Bettinger, C.J., Patanavanich, S., Chignozha, L., Ben-Joseph, E., Galakatos, A., Pryor, H., Pomerantseva, I., Masiakos, P.T., Faquin, W., Zumbuehl, A., Hong, S., Borenstein, J., Yurdumakan, B., Raravikar, N.R., Ajayan, P.M., Dhinojwala, A., *Synthetic gecko foot-hairs from multiwalled carbon nanotubes*, Chem.Commun. 30, pp. 3799 – 3801, 2005

Scanned with OKEN Scanner

42. Shin, H., Jo, S., Mikos, A.G., *Modulation of marrow stromal osteoblast adhesion on biomimetic oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] hydrogels modified with arg-gly-asp peptides and a poly(ethyleneglycol) spacer*, J. Biomed. Mater. Res. 61, pp. 169 – 179, 2002

43. Behravesh, E., Sikavitsas, V.I., Mikos, A.G., *Quantification of ligand surface concentration of bulk modified biomimetic hydrogels,* Biomaterials 24, pp. 4365 – 4374, 2003

44. Hiratani, H., Fujiwara, A., Tamiya, Z., Mizutani, Z., Alvarez-Lorenzo, C., *Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses,* Biomaterials 26, pp. 1293 – 1298, 2005

45. Hilt, J.Z., Byrne, M.E., *Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules*, Adv. Drug Del. Rev. 56, pp. 1599 – 1620, 2004

46. Chiriță, M., *Sisteme de eliberare a substanțelor bioactive,* vol. I, Ed. Tehnopress, 2004

47. Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., *Silk-based biomaterials*, Biomaterials 24, pp. 401–416, 2003

48. Wallace, D.G., Rosenblatt, J., *Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering*, Adv. Drug Deliv. Rev. 55, pp. 1631–1649, 2003

49. Kuo, C.K., Ma, P.X., *Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, Gelation rate and mechanical properties,* Biomate-rials 22, pp. 511 – 21, 2001

50. Zhao, F., Yin, Y., Lu, W.W., Leong, J.C., Zhang, W., Zhang, J., Zhang, M., Yao, K., *Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/-chitosan-gelatin network composite scaffolds,* Biomaterials 23, pp. 3227 – 3234, 2002

51. Mithieuxa, S.M., Raskob, J.E.J., Weissa, A.S., *Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers,* Biomaterials 25, pp. 4921 – 4927, 2004

52. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*, Ann. NY Acad. Sci. 944, pp. 62 – 73, 2001

53. Rhee, S.H., Suetsugu, Y., Tanaka, J., *Biomimetic configurational arrays of hydroxy-apatite nanocrystals on bio-organics*, Biomaterials 22, pp. 2843 – 2847, 2001

54. Khor, E., Lim, L.Y., *Implantable applications of chitin and chitosan,* Biomaterials 24, pp. 2339 – 2349, 2003

55. Vepari, C., Kaplan, D.L., *Silk as a biomaterial*, Prog. Polym. Sci. 32, pp. 991 – 1007, 2007

Scanned with OKEN Scanner

70. Wongpanit, P., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Bunaprasert, T., Tabata, Y., Rujiravanit, R., *Preparation and characterization of chitin whisker-reinforced silk fibroin nanocom-posite sponges*, European Polymer Journal 43, pp. 4123 – 4135, 2007

71. Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M., Kaplan, D.L., *Three-dimensional aqueous -derived biomaterial scaffolds from silk fibroin*, Biomaterials 26, pp. 2775 – 2785, 2005

72. Mauney, J.R., Nguyen, T., Gillen, K., Kirker-Head, C., Gimble, J.M., Kaplan, D.L., *Engine-ering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds*, Biomaterials 28, pp. 5280 – 5290, 2007

73. Tan, W., Krishnaraj, R., Desai, T., *Evaluation of nanostructured composite collagen – chitosan matrices for tissue engineering*, Tissue Eng 7, pp. 203 – 11, 2001

74. Zhao, Feng, Yin, Yuji, Lu, W.W., Leong, J.C., Zhang, W., Zhang, J., Zhang, M., Yao, K., *Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyl-apatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds*, Biomaterials 23, pp. 3227 – 3234, 2002

75. Drotleff, S., Lungwitz, U., Breunig, M., Dennis, A., Blunk, T., Tessmar, J., Gopferich, A., *Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58, pp. 385 – 407, 2004

76. Hacker, M., Tessmar, J., Neubauer, M., Blaimer, A., Blunk, T., Gopferich, A., Schulz, M.B., *Towards biomimetic scaffolds: Anhydrous scaffold fabrication from biodegradable amine-reactive diblock copolymers*, Biomaterials 24, pp. 4459 – 4473, 2003

77. Taboas, J.M., Maddox, R.D., Krebsbach, P.H., Hollister, S.J., *Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds*, Biomaterials 24, pp.181 – 194, 2003

78. Endres, M., Neumann, K., Schröder, S.E.A., Vetterlein, S., Morawietz, L., Ringe, J., Sittinger, M., Kaps, C., *Human polymer-based cartilage grafts for the regeneration of articular cartilage defects*, Tissue and Cell, Volume 39, Issue 5, pp. 293 – 301, 2007

79. Adhikari, R., Gunatillake, P.A., Griffiths, I., Tatai, L., Wickramaratna, M., Houshyar, S., Moore, T., Mayadunne, R.T.M., Field, J., McGee, M., Carbone, T., *Biodegradable injectable polyurethanes: Synthesis and evaluation for orthopaedic applications*, Biomaterials, Volume 29, Issue 28, pp. 3762 – 3770, 2008

Scanned with OKEN Scanner

93. Schuler, M., Owen, G.Rh., Hamilto, D.W., de Wild, Michael, Textor, M., Brunette, D.M., Tosatti, S.G.P., *Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: A cell morphology study*, Biomaterials 27. pp. 4003 – 4015, 2006

94. Ai Lin Chuna, b, Moralezb, J.G., Webstera, T.J., Fenniri, H., *Helical rosette nanotubes: A biomimetic coating for orthopedics?*, Biomaterials 26, pp. 7304 – 7309, 2005

95. Zhang, Q., Leng, Y., Xin, R., *A comparative study of electrochemical deposition and biomimetic deposition of calcium phosphate on porous titanium*, Biomaterials 26, pp. 2857 – 2865, 2005

96. Hattara, S., Asselina, A., Greenspanb, D., Oboeufa, M., Berdala, A., Sautiera, J-M., *Potential of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentia-tion*, Biomaterials 26, pp. 839 – 848, 2005

97. Wanga, X., Lia, Y., Weia, J., de Grootb, K., *Development of biomimetic nanohydroxy-apatite / poly-(hexamethylene adipamide) composites*, Biomaterials 23, pp. 4787 – 4791, 2002

98. Bigia, A., Boaninia, E., Braccia, B., Facchinib, Al., Panzavoltaa, S., Segattib, F., Sturbaa, L., *Nanocrystal-line hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method*, Biomaterials 26, pp. 4085 – 4089, 2005

99. Choua, Y.F., An Chioub, W., Xuc, Y., Dunna, J.C.Y., Wua, B.M., *The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite*, Biomaterials 25, pp. 5323 – 5331, 2004

100. Hutchens, A.S., Benson, R.S., Evans, B.R., O'Neill, H.M., Rawn, C.J., *Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel*, Biomaterials 27, pp. 4661 – 4670, 2006

101. Rusu, V.M., Nga, C.H., Wilkec, M., Tierscha, B., Fratzld, P., Petera, M.G., *Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic–inorganic composite materials*, Biomaterials 26 pp. 5414 – 5426, 2005

102. Grassmann, P.L. Obmann, *Biomimetic nucleation and growth of CaCO3 in hydrogel incorporating carboxylate groups*, Biomaterials 25, pp. 277 – 282, 2004

103. Chunga, Y.C., Chiub, Y.H., Wuc, Y.W., Taod, Y.T., *Self-assembled biomimetic monolayers using phospholipid containing disulfides*, Biomaterials 26, pp. 2313 – 2324, 2005

104. Tana, J., Saltzmana, W.M., *Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure*, Biomaterials 25, pp. 3593 – 3601, 2004

105. Masson, I., Beaussier, H., Isăcilă, A., Zidi, M., Laurent, S., Boutouyrie, P., *Biomechanical Analysis of Human Common Carotid Arteries by Segmented Approach on Non-Invasive Echotracking Systems*, Artery Research, Volume 1, Issue 2, p. 48, 2007

Scanned with OKEN Scanner

117. Islam, M.E., Das, B.K., Hakim, F., Rahman, Q.B., Molla, M.R., *A study on demineralized allogenic bone graft with platelet rich plasma used in periodontal bone*, International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Volume 36, Issue 11, p. 050, 2007

118. Pan, S.X., Li, Y., Feng, H.L., Bai, W., Gu, Y.Y., *In vitro aging of mineralized collagen-based composite as guided tissue regeneration membrane*, Materials Science and Engineering: C, Volume 26, Issue 4, pp. 724 – 729, 2006

119. Tampieri, A., Celotti, G ., Landi, E., Sandri, M., Roveri, N., Falini, G., *Biologically inspired synthesis of bone like composite: self assembled collagen fibers / hydroxy-apatite nanocrystals*, J. Biomed. Mater. Res. 67A, pp. 618 – 625, 2003

120.Cui, F.Z., Li, Y., Ge, J., *Self-assembly of mineralized collagen composites*, Materials Science and Engineering: R: Reports, Volume 57, Issues 1-6, pp. 1 – 27, 2007

121. Balooch, M., Habelitz, S., Kinney, J.H., Marshall, S.J., Marshall, G.W., *Mechanical properties of mineralized collagen fibrils as influenced by demineralization*, Journal of Structural Biology, Volume 162, Issue 3, pp. 404 – 410, 2008

122. Hollinger, J.O., Einhorn, T.A., Doll, B.A., Sfeir, C., *Bone tissue engineering*, Boca Raton, CRC Press, 2005

123. Kim, H.W., Knowles, J.C., Kim, H.E., *Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds*, J. Biomed. Mater. Res., Part A, 72A, pp. 136 – 145, 2005

124. Siegmund, T., Allen, M.R., Burr, D.B., *Failure of mineralized collagen fibrils: Modeling the role of collagen cross-linking*, Journal of Biomechanics, Volume 41, Issue 7, pp. 1427 – 1435, 2008

125. Kanungo, B.P., Silva, E., Van Vliet, K., Gibson, L.J., *Characterization of mineralized collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone regeneration*, Acta Biomaterialia, Volume 4, Issue 3, pp. 490 – 500, 2008

126. Kokubo, T., Hanakawa, M., Kawashita, M., Minoda, M., Beppu, T., Miyamoto, T., Nakamura, T., *Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF*, Biomaterials 25, pp. 4485 – 4488, 2004

127. Yoon, B.H., Kim, H.W., Lee, S.H., Bae, C.J., Koh, Y.H., Kong, Y.M., Kim, H.E., *Stability and cellular responses to fluorapatite–collagen composites*, Biomaterials 26, pp. 2957 – 2963, 2005

128. Kim, H.W., Kim, H.E., Salih, V., *Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds*, Biomate-rials 26, pp. 5221 – 5230, 2005

Scanned with OKEN Scanner

PARTEA a II-a

COMPONENTE ALE LUMII VII

Scanned with OKEN Scanner

Organismele vii au un înalt grad de organizare şi o mare complexitate. Acestea sunt formate dintr-o diversitate de celule cu structuri interne complicate, adaptate pentru a îndeplini anumite funcţii şi conţinând multe tipuri de molecule.

Materia vie presupune o anumită organizare, un anumit mod de existenţă, o mişcare proprie, mişcarea biologică sau viaţa.

Celula întruneşte toate componentele necesare desfăşurării proceselor caracteristice vieţii. Ea este vie nu pentru că structurile subcelulare din care este alcătuită sunt vii, ci pentru că se desfăşoară procese în care structurile subcelulare au roluri bine definite. Celula este cea mai mică unitate a materiei vii în care se desfăşoară metabolismul. Structurile subcelulare sunt formate, la rândul lor, din macro- şi micromolecule.

Biomoleculele se găsesc în organismele vii, participă la procesul metabolic şi la întreţinerea unui organism viu, aşa cum sunt: proteinele, glucidele, lipidele, acizii nucleici şi apa.

Tipurile de biomolecule pot fi grupate în molecule mici (lipide fosfolipide, glicolipide, steroli, vitamine, hormoni, carbohidraţi, zahăr, dizaharide), monomeri (aminoacizi, nucleotide, fosfaţi, monozaharide), polimeri (peptide, oligopeptide, polipeptide, proteine, acizi nucleici – ADN, ARN –, oligozaharide, polizaharide). Biomoleculele sunt produse ale selecţiei în timpul apariţiei şi evoluţiei vieţii pe pământ şi, firesc, sunt cele mai corespunzătoare funcţiei lor biologice. Biomoleculele conţin, în primul rând, carbon şi hidrogen, împreună cu oxigen, azot, fosfor şi sulf. Sunt, uneori, şi alte elemente încorporate, dar în cantităţi mult mai mici.

Carbonul, hidrogenul, oxigenul şi azotul formează masa dominantă a celor mai multe celule. Aceste patru elemente formează compuşi care participă la procesele de constituire, în ansamblu, starea vie. Ele formează legături puternice şi stabile prin punerea în comun a electronilor, combinându-se între ele şi rezultând un mare număr de compuşi covalenţi.

Întrucât un atom de carbon este acceptor sau donor de patru electroni, pentru a realiza un octet exterior, el poate forma legături covalente cu alţi patru atomi de carbon. Atomii de carbon legaţi covalent pot forma catene liniare, ramificate sau ciclice, rezultând un mare număr de molecule organice diferite. De asemenea, atomii de carbon formează legături covalente cu hidrogenul, oxigenul, azotul şi sulful, introducându-se, astfel, în structura moleculelor organice, numeroase tipuri de grupări funcţionale.

Compuşii organici ai carbonului se prezintă într-o mare diversitate de structuri tridimensionale formate prin legături carbon–carbon, datorită configuraţiei tetraedrice a perechilor de electroni din jurul carbonului simplu legat.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

BIOMOLECULE, CELULĂ, ŢESUTURI

2.1. Biomolecule 67
2.2. Celula 71
2.2.1. Consideraţii generale 71
2.2.2. Celulele procariote 73
2.2.3. Celulele eucariote 76
2.2.3.1. Caracteristici generale 76
2.2.3.2. Membrana celulară 78
2.2.3.3. Nucleul 80
2.2.3.4. Citoplasma 84
2.2.3.5. Ciclul celular, proliferarea şi creşterea celulelor 94
2.2.3.6. Consideraţii generale privind îmbătrânirea 97
2.3. Ţesuturile 98
2.3.1. Ţesuturile epiteliale 100
2.3.2. Ţesuturile conjunctive 109
2.3.3. Ţesutul muscular 116
2.3.4. Ţesutul nervos 117
2.3.5. Ţesutul sanguin şi limfatic 117

Bibliografie *117*

2.1. BIOMOLECULE

Biomoleculele sunt moleculele proprii materiei vii.

Compoziţia chimică a organismelor vii este calitativ diferită de cea a mediului în care trăiesc. Cei mai mulţi compuşi chimici ai organismelor vii sunt compuşii organici ai carbonului. Multe biomolecule conţin azot.

În materia nevie, carbonul și azotul sunt mai rare. Aceștia se întâlnesc în atmosferă și în scoarța pământului numai în forme anorganice simple: dioxid de carbon, azot molecular, carbonați, azotați etc.

Compușii organici prezenți în materia vie se întâlnesc într-o varietate extraordinară și mulți dintre ei sunt extrem de complecși.

Celulele cele mai simple și mai mici, *procariotele,* conțin un număr foarte mare de molecule organice diferite. Bacteria *Escherichia coli*, de exemplu, conține aproximativ 5 000 compuși diferiți, din care circa 3 000 de tipuri de proteine diferite și 1 000 de tipuri de acizi nucleici.

Cea mai mare parte din substanțele organice sunt macromolecule cu mase moleculare foarte mari (proteine, acizi nucleici, dar și polimeri ca amidonul, celuloza).

Animalele și plantele superioare conțin proteine și acizi nucleici într-o varietate și mai mare. De exemplu, în organismul uman, se găsesc circa 10 000 de proteine diferite. Fiecare specie are setul său chimic distinct de proteine și acizi nucleici. Deoarece există 1,5 milioane de specii de organisme vii, se poate calcula că toate acestea conțin împreună $10^{10} - 10^{12}$ diferite tipuri de proteine și 10^{10} diferite tipuri de acizi nucleici. Dintre toți acești compuși organici, în jur de un milion au structura chimică cunoscută.

Imensa diversitate de molecule organice din organismele vii se reduce la o mare simplitate. Macromoleculele celulelor sunt compuse din molecule mici care se înșiruie într-o anumită ordine. Astfel, amidonul și celuloza constau din lanțuri de molecule de glucoză legate covalent. Diferitele tipuri de proteine sunt formate din lanțuri lungi de aminoacizi, așezați în ordini diferite. În proteine, se găsesc, obișnuit, 20 de tipuri de aminoacizi care sunt aranjați în secvențe variate, formând o gamă foarte largă de proteine. Cei aproximativ 1 000 de acizi nucleici din *Escherichia coli*, ca și acizii nucleici din alte organisme vii, care sunt de două feluri: acid dezoxiribonucleic (ADN) și acid ribonucleic (ARN), sunt constituiți din opt nucleotide, patru în ADN și patru în ARN. Toți cei 20 de aminoacizi și cele opt nucleotide sunt aceiași în toate organismele.

Unele molecule simple, care sunt unități constituente ale macromoleculelor, pot îndeplini mai multe funcții în celula vie. Astfel, aminoacizii care servesc ca unități constitutive pentru proteine sunt și precursori ai hormonilor, alcaloizilor, porfirinelor, a unor pigmenți organici etc. Unele nucleotide, unități constituente ale acizilor nucleici, servesc ca molecule purtătoare de energie sau coenzime.

Deoarece miile de macromolecule diferite prezente în celule sunt formate din numai câteva tipuri de molecule simple, care au rolul de unități

Scanned with OKEN Scanner

constituente, se poate afirma că există o mare simplitate în organizarea moleculară a celulelor (1).

Întrucât biomoleculele – unități constituente – sunt identice la speciile cunoscute, se poate afirma că toate organismele vii au un strămoş comun, iar identitatea fiecărei specii este dată de prezența unor seturi caracteristice de acizi nucleici şi proteine (1).

Biomoleculele, bine definite din punctul de vedere al structurii şi proprietăților acestora, sunt produse de selecție în timpul evoluției, fiind, probabil, moleculele cele mai potrivite funcției lor biologice şi reacționează unele cu altele în moduri specifice. Mărimea şi forma lor determină specificitatea interacțiilor biologice, ca şi ultrastructura celulelor vii.

Din totalul elementelor chimice naturale din scoarța pământului, numai 27 se găsesc în organismele vii şi nu toate sunt esențiale pentru fiecare specie: H, O, C, N, P, S, Na, K, Mg, Ca, Cl, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, B, Al, V, Mo, I, Si, Sn, Ni, Cr, F, Se.

Hidrogenul, oxigenul, carbonul şi azotul reprezintă aproximativ 96 % din masa moleculelor celor mai multe celule. Aceste elemente au proprietatea comună de a forma cu uşurință legături covalente, prin punerea în comun a electronilor. Pentru a forma legături covalente stabile prin completarea ultimului strat de electroni, hidrogenul are nevoie de un electron, oxigenul de doi, azotul de trei şi carbonul de patru. Aceste patru elemente se combină între ele, formând un mare număr de compuşi covalenți. Carbonul, azotul şi oxigenul pot pune în comun una sau două perechi de electroni pentru a forma legături simple sau duble, proprietate care le conferă o mobilitate considerabilă a legăturilor chimice. Atomii de carbon se pot lega între ei, un atom de carbon putând forma legături covalente cu alți patru atomi de carbon. Atomii de carbon legați covalent în acest fel pot forma catene liniare, ramificate sau ciclice pentru o mare varietate de molecule organice. Deoarece atomii de carbon formează legături covalente cu hidrogenul, oxigenul, azotul şi sulful, în structura moleculelor organice, se pot introduce nenumărate tipuri de grupări funcționale (1).

Toate biomoleculele derivă din precursori simpli, cu masă moleculară mică, proveniți din mediul exterior celulei (dioxid de carbon, apă, amoniac, azot). Precursorii sunt transformați de către materia vie, prin procese metabolice (piruvat, citrat, malat, gliceraldehidă–3–fosfat), în compuşi organici care sunt biomoleculele de bază sau unitățile constituente (acizi aminici, nucloetide, monozaharide, acizi graşi, glicerol). Unitățile constituente se leagă între ele, formând macromoleculele celulei cu mase moleculare mari (proteine, acizi nucleici, polizaharide, lipide). Lipidele au masa moleculară mică (750

Scanned with OKEN Scanner

– 1 500). Unele lipide se asociază formând particule mari şi de aceea sunt considerate, în mod arbitrar, în rândul macromoleculelor.

În celulă, macromoleculele se asociază formând sisteme supramoleculare, ca lipoproteinele, ribozomii (complecşi ai acizilor nucleici cu proteinele) etc. Asamblarea componentelor în sistemele supramoleculare este destul de stabilă, cu toate că nu se face prin legături covalente, ci prin forțe slabe necovalente, interacții hidrofobe sau forțe van der Waals.

În ultima etapă de organizare a structurii celulare, diferitele sisteme supramoleculare sunt asamblate în organitele celulei: nuclei, mitocondrii, cloroplaste etc.

Se menționează că toate celulele vii conțin cam aceleaşi proporții din principalele clase de biomolecule şi au funcții identice.

S-a arătat mai sus că macromoleculele din organismele vii sunt formate din câteva tipuri de molecule, care au rolul de unități constituente. S-a sugerat că primele celule care au apărut pe pământ ar fi fost formate din câteva zeci de molecule organice: 20 de aminoacizi, cinci baze azotate (uracil, timină, citozină, adenină, guanină), unul sau mai mulți acizi graşi, două glucide, dintre alcooli, glicerolul şi dintre amine, colina. Acest set de circa 30 de molecule primordiale poate fi considerat ca bază de pornire a tuturor biomoleculelor ulterioare (1).

Organismele vii au evoluat şi evoluează spre forme din ce în ce mai diferențiate şi mai complexe, ca şi biomoleculele care au devenit de o mare varietate şi complexitate şi care au provenit din biomoleculele primordiale. Astăzi se cunosc peste 150 de aminoacizi, care, aproape toți, provin din cei 20 de aminoacizi de bază care intră în structura proteinelor. Se cunosc zeci de nucleotide şi derivați ai nucleotidelor, toți fiind descendenți ai primelor cinci baze azotate. Sunt peste 70 de glucide simple care derivă biologic din glucoză, iar din ele se formează, în diferite organisme, o mare varietate de polizaharide. Există numeroşi acizi graşi, toți provenind din acizii graşi primordiali.

În tabelul 2.1., sunt prezentate câteva exemple de compuşi proveniți din moleculele primordiale (1).

Tabelul 2.1.

Derivați de biomolecule primordiale

Arginină	*D – Glucoză*
Ornitină	D – Manoză
Citrulină	D – Fructoză
	D – Galactoză

Scanned with OKEN Scanner

Prolină
3 – Hidroxiprolină
4 – Hidroxiprolină
4 – Hidroximetilprolină
4 – Metilprolină
4 – Cetoprolină

Leucină
β – Hidroxileucină
δ – Hidroxileucină
γ, δ – Dihidroxileucină
γ – Hidroxileucină
N – Metilleucină

Guanină
1 – Metilguanină
2 – Metilguanină
2 – Dimetilguanină
7 – Metilguanidina

N – Acetilglucozamină
Acid D – glucuronic
D – Glucozo – 6 – fosfat
Acid ascorbic
Inozitol
Zaharoză
Maltoză
Lactoză

Acid palmitic
Acid leic
Acid stearic
Acid lauric
Acid palmitoleic
Aldehidă palmitică
Aldehidă stearică

Multe biomolecule specializate, extrem de complexe, par a fi foarte puțin asemănătoare cu cele 30 de biomolecule primordiale.

Mărimea și forma tridimensională și topografia suprafeței fiecărui tip de biomoleculă au o semnificație deosebită în biochimia și biologia celulară. De exemplu, moleculele proteice au, de obicei, în condiții intracelulare normale, o singură conformație tridimensională caracteristică, numită conformație nativă, care este indispensabilă pentru activitatea biologică (1).

2.2. CELULA

2.2.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Celulele sunt unități structurale și funcționale în toate organismele vii. Unele organisme, ca bacteriile, sunt unicelulare, altele, precum cele umane, sunt multicelulare și au un număr mare de celule estimate la 10^{15} celule. Fiecare

Scanned with OKEN Scanner

celulă este în stare să absoarbă nutriente şi să le transforme în energie, să îndeplinească funcţii specializate şi să reproducă ceea ce este necesar.

Câteva date din istoria vieţii pe pământ se arată că, în urmă cu 4,5 bilioane de ani, s-a format pământul, în urmă cu 3,5 bilioane de ani, apar celulele procariote, bacteriile, deci apare viaţa, iar în urmă cu 0,5 bilioane de ani, apar eucariotele.

Celula este unitatea de bază a vieţii. Ea este cea mai mică entitate care poate exista într-un sistem viu, independent. Celulele sunt produse ale unei îndelungate evoluţii şi au o ordine internă complexă, ce le conferă capacitatea de creştere, dezvoltare şi reproducere, precum şi o organizare dinamică. Celulele se află în relaţii de echilibru cu mediul exterior, au capacitatea de autoreglare şi adaptare la variaţiile condiţiilor de mediu (2), au un înalt grad de organizare, care se menţine datorită faptului că, din punct de vedere termodinamic, sunt un „sistem deschis", adică au o structură consumatoare de energie pe seama mediului exterior.

Celulele au proprietatea de autoreproducere şi capacitatea de a parcurge diferite stadii în mod ciclic (ciclul vital, ciclul ereditar etc.).

Funcţionarea normală a corpului depinde de ce se petrece în interiorul numeroaselor celule de diferite tipuri.

Ca forme elementare de organizare a întregii lumi vii, celulele pot fi sistematizate în două mari clase după caracterele lor morfologice: *procariote* şi *eucariote*.

Toate organismele vii pot fi clasificate în cinci regnuri: *animale, plante, ciuperci, protociste (protiste)* şi *bacterii*.

Animalele, definite ca organisme vii dotate cu reacţie, sunt *metazoare (pluricelulare)* şi se diferenţiază de *protozoare (animale monocelulare)*. Termenul de *animale* este strict rezervat metazoarelor, care reprezintă o asamblare *monophyletică*, în timp ce protozoarele sunt *poliphyletice*.

Plantele sunt organisme vii lipsite de reacţie şi cuprind plantele verzi (embriophytele), unele ciuperci şi majoritatea algelor.

Ciupercile sunt un ansamblu poliphytic şi cuprind: *mixomicetele, oomicetele* şi *eumicetele*. Ciupercile absorb moleculele de hrană direct din alte surse organice vii sau nevii. Ele sunt constituite din filamente multicelulare.

Protocistele (protistele) au o organizare care nu seamănă cu a animalelor *(metazoare)* şi nici cu a plantelor *(embriophyte)*. Ele grupează un vast ansamblu poliphyletic de procariote şi eucariote. Dintre protiste, fac parte *amoeba* din ordinul *Rhizopoda* (exemplu, *Acantamoeba histolytica*), *flagelatele* (exemplu, *Chlamydomonas reinhardite*), ciliate (exemplu, *Paramoecium*).

Bacteriile sunt cele mai numeroase de pe pământ. O bacterie este formată dintr-o singură celulă procariotă, vie, autonomă.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.2. CELULELE PROCARIOTE

Celulele procariote sunt primele apărute în evoluția biologică. Sunt foarte mici, relativ simple. Din această clasă, fac parte: *bacteriile, algele albastre–verzui, spirochetele, rickettsiile* și *organismele microplasmatice*, cum sunt cele de *tip pleuropneumonia*.

Celulele procariote au o singură membrană, membrana celulară, care, de obicei, este înconjurată de un perete celular rigid, nu au nucleu delimitat de o membrană și nici organite cu membrană, ca mitocondrii sau reticul endoplasmic. Ele conțin un singur cromozom, care constă dintr-o singură moleculă de ADN dublu helicoidală, dens spiralată, formând zona nucleară (fig. 2.1.). Procariotele se înmulțesc, în general, prin diviziune asexuată.

Majoritatea cunoștințelor despre bazele moleculare ale geneticii provin din studiul diferitelor tulpini și mutanți de *Escherichia coli*, ca și bacteriofagi de *Escherichia coli*, o bacterie aerobă, care face parte din grupul de bacterii *coli*, ce se găsesc, în mod specific, în tractul intestinal uman. Celula matură (fig. 2.2.) are forma unei frânghii cilindrice de 2 μm lungime și 1 μm diametru.

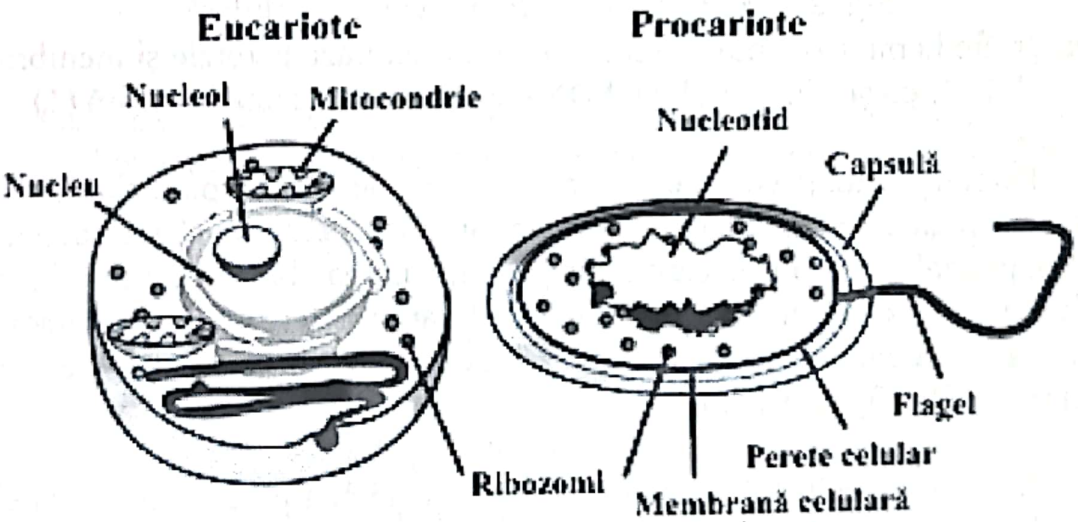


Fig. 2.1. Reprezentare schematică a celulelor eucariote și procariote. Desenul celulei din dreapta este tipic la om (eucariote) și evidențiază structura internă ce include nucleul, nucleolul, mitocondria și ribozomii. Desenul celulei din stânga este caracteristic pentru bacterii (procariote) și arată cum ADN bacterian se găsește în stuctura numită *nucleoid*.

Scanned with OKEN Scanner

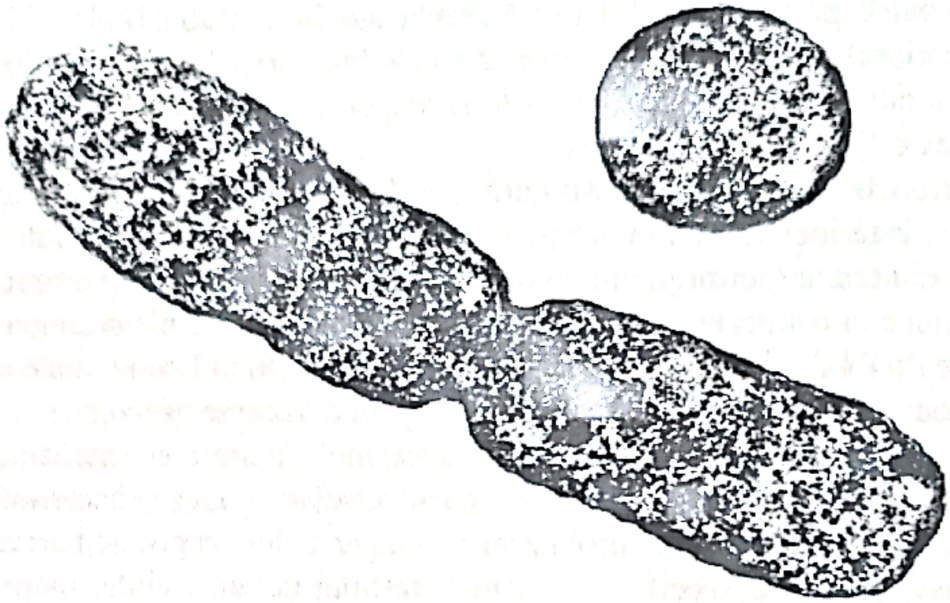


Fig. 2.2. *Escherichia coli* în diviziune celulară (fotografie la microscopul electronic). Se evidențiază peretele și membrana celulară, ca și filamentul de ADN care constituie zona nucleară (1).

Peretele celular conține un schelet rigid de lanțuri polizaharidice de care sunt legate scurte lanțuri peptidice. Suprafața exterioară este acoperită cu lipopolizaharide. Pilii, care sunt prezenți numai la unele bacterii, sunt prelungiri ale peretelui celular. Peretele celular protejează bacteria împotriva umflării în mediu hipotonic. Acesta este poros și permite trecerea celor mai mici molecule (fig. 2.3.) (1).

Membrana celulară conține aproximativ 45 % lipide și 55 % proteine; lipidele formează o fază nepolară continuă. Învaginările membranei celulare se numesc *mezozomi*. Membrana este un strat cu o permeabilitate selectivă, care lasă apa, anumite substanțe nutritive și ionii metalici să treacă liberi. Enzimele care transformă energia alimentară în energie înmagazinată, în ATP, sunt localizate în membrană.

Scanned with OKEN Scanner

Zona nucleară constă dintr-un singur cromozom format din ADN dublu helicoidal, strâns spiralat, având 2 nm diametru şi 1,2 nm lungime. ADN-ul este purtătorul informaţiei genetice. În timpul diviziunii, fiecare catenă este replicată pentru a da molecule fiice, dublu helicoidale. De pe o catenă de ADN, mesajul este transcris pentru a forma ARN mesager.

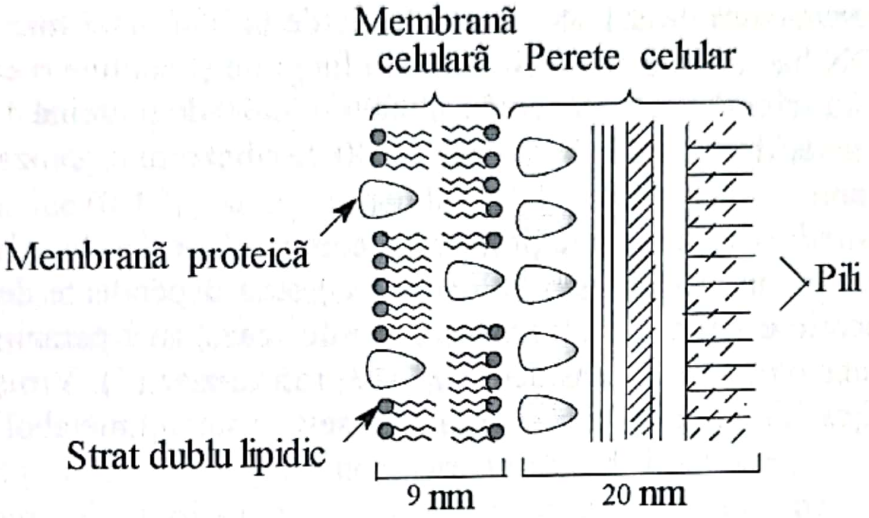


Fig. 2.3. Peretele şi membrana celulară

Fiecare celulă de *Escherichia coli* conţine aproximativ 15 000 ribozomi. Fiecare ribozom este format dintr-o subunitate mare şi una mică (fig. 2.4.).

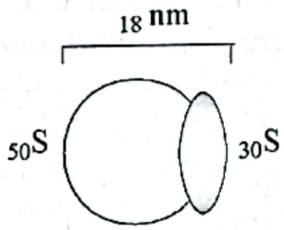


Fig. 2.4. Ribozom

Fiecare subunitate conţine aproximativ 65 % ARN şi 35 % proteine. Ribozomii sunt locurile unde are loc sinteza proteinelor.

Escherichia coli şi multe alte bacterii conţin granule de depozitare, care sunt polimeri glucidici. Unele bacterii conţin granule de poli-β-hidroxibutirat. Când este nevoie de energie, aceşti polimeri sunt degradaţi enzimatic până la glucoză liberă sau acid β-hidroxibutiric liber.

Scanned with OKEN Scanner

Partea solubilă a citoplasmei (*citosolul*) este foarte vâscoasă; concentrația proteinelor este foarte mare, de peste 20 % (1). Cele mai multe proteine din citosol sunt enzimele necesare metabolismului. Citosolul conține, de asemenea, intermediari metabolici și săruri anorganice.

Principalele proprietăți ale procariotelor sunt capacitatea de a se înmulți foarte repede și de a se adapta relativ ușor la variațiile condițiilor de mediu.

Bacteriile sunt procariote cu o mărime de ordinul unui micron. Molecula de ADN bacterian este de circa 1 mm lungime și conține o cantitate de informație suficientă pentru a codifica 2 000 – 3 000 de proteine diferite. Citoplasma bacteriilor conține 20 000 – 30 000 de ribozomi organizați sub formă de polizomi.

Virusurile, deși au unele proprietăți comune cu cele ale celulelor (autoreproducerea, ereditatea, variabilitatea etc.) sunt dependente de celulele–gazdă (procariote sau eucariote) pe care le infectează, sunt paraziți obligatorii și, de aceea, nu pot fi considerați celule propriu-zise (2). Viruşii nu sunt considerați ca fiind „vii", din cauză că le lipseşte sistemul metabolic.

2.2.3. CELULELE EUCARIOTE

2.2.3.1. CARACTERISTICI GENERALE

Eucariotele sau *eucitele* sunt mult mai mari și mai complexe decât celulele procariote. Volumul celor mai multe dintre celulele eucariote este de 1 000 până la 10 000 de ori mai mare decât al procariotelor tipice. Celulele tuturor *organismelor superioare din regnul animal* și *vegetal sunt eucariote*, precum și celulele *fungiilor, protozoarelor neprocariote* și a majorității *algelor.*

În alcătuirea eucariotelor, se disting trei părți principale: *nucleul,* organit al coordonării proceselor celulare, *citoplasma* ce conține numeroase organite și *membrana celulară* ce controlează schimburile cu mediul exterior.

Celulele umane au, în mod obișnuit, un diametru de 10–30 μm, un volum de 200 – 15 000 μm^3, iar masa lor este de 10^{-12}–10^{-8} dal. Sunt celule și mai mici, precum *limfocitele*, care au diametrul de 6,5 μm, *celulele granulare* din creierul mic, cu diametrul de 3 – 4 μm și celule mai mari ca *celulele nervoase*, care au diametrul în jur de 100 μm sau *ovocitul uman* cu diametrul de 250 μm. *Ovocitele de păsări* au un diametru de câțiva centimetri. În corpul uman adult, sunt circa 10^{15} celule, iar un copil nou născut are 10^{12} celule sub forma a 1 000 de tipuri de celule diferite. În corpul omenesc, *celulele sanguine* reprezintă populația cea mai numeroasă.

Scanned with OKEN Scanner

95% din masa celulei o reprezintă elementele: H (10%), O (64 %), C (18 %) şi N (2,5 %), la care se mai adaugă 0,5 – 2 % de Ca, P, Na, K, S, Fe, Mg şi Cl şi toate împreună formează *grupa macroelementelor*. De asemenea, un număr de până la 30 de elemente: Al, Ag, As, Ba, Br, Cd, Cr, Co, Cu, F, Ga, Hg, I, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sn, Se, Si, Sr, Va, Zn, se găsesc în cantități foarte mici şi de aceea sunt denumite *microelemente*. Microelementele scrise subliniat s-au dovedit a fi esențiale pentru desfăşurarea normală a proceselor vitale.

Celulele sunt alcătuite din molecule organice: proteine (7 – 20 %), lipide (1 – 3 %), glucide (1 – 2 %), ADN (0,4 %), ARN (0,7 %), alte molecule organice (0,4 %), săruri minerale (1,5 %) şi apă (60 – 90 %).

Substratul proceselor vitale îl reprezintă moleculele organice şi, mai ales, cele proteice. Substanțele organice realizează edificiul extrem de complex al substratului molecular al vieții (2).

Apa este indispensabilă desfăşurării proceselor vitale, dar nu este substratul însuşi al proceselor vitale, iar sărurile minerale participă la realizarea condițiilor fizico-chimice necesare desfăşurării proceselor vitale.

La baza alcătuirii structurilor celulare, se află carbonul, acesta formând compuşi foarte lent reactivi, într-o mare diversitate, care, practic, este infinită.

Moleculele organice îşi datorează proprietățile unui număr limitat de grupări funcționale fixate pe structura scheletului de carbon.

Carbonul formează legături covalente cu alți atomi de carbon, cât şi cu H, O, N, S şi P. La organizarea structurii celulare, participă şi legăturile slabe necovalente, intermoleculare sau forțele van der Waals, precum şi legăturile de hidrogen.

Proteinele sunt elementele constitutive ale tuturor organitelor celulare şi, de asemenea, sunt catalizatorii enzimatici ai tuturor reacțiilor chimice, care stau la baza proceselor vitale specifice celulei.

Acizii nucleici participă la biosinteza tuturor tipurilor de proteine celulare.

Glucidele se află în celule sub formă de glicogen (glucidul de depozit), glicoproteine şi glicolipide. Acestea două din urmă intră în compunerea suprafeței celulare şi a unor organite.

Lipidele se găsesc în celule sub formă de depozite cu scopuri energetice sau ca lipoproteine care intră în structura tuturor citomembranelor.

În figura 2.5., se prezintă schema organizării unei celule animale cu organitele celulare.

Scanned with OKEN Scanner

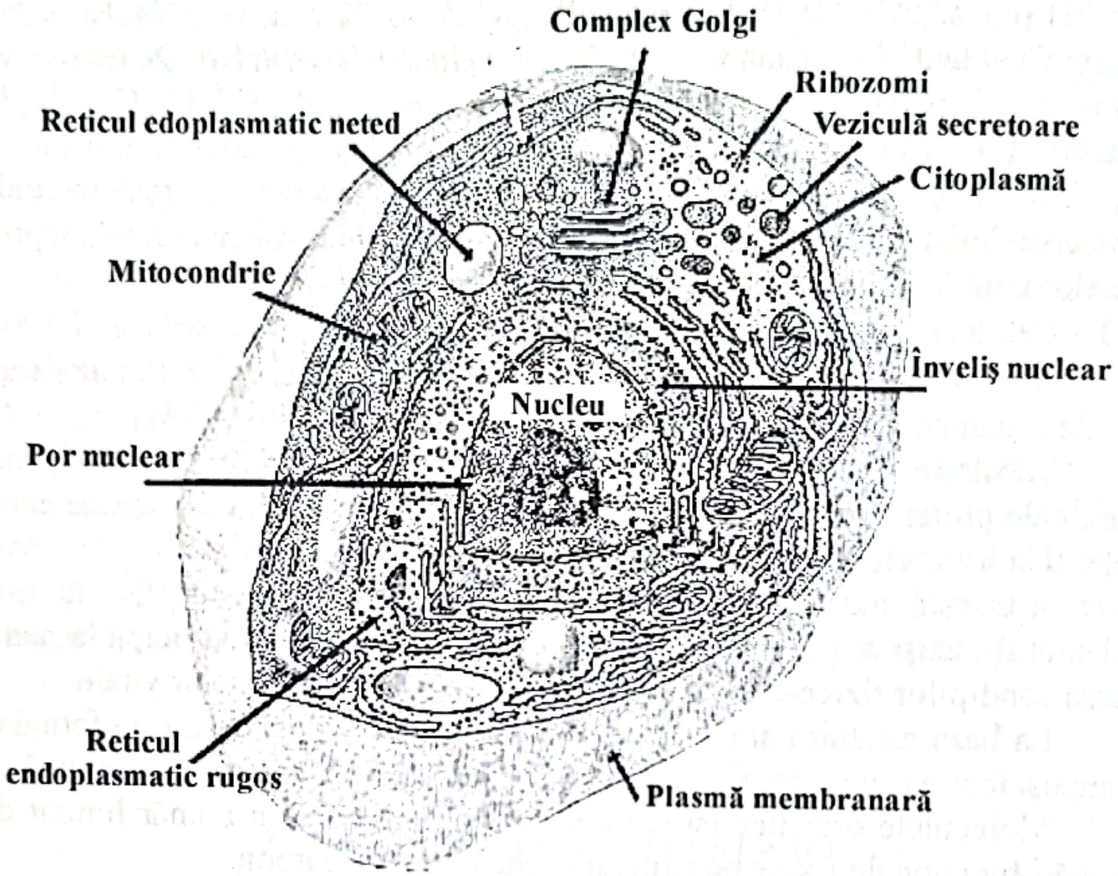


Fig. 2.5. Schema organizării structurii unei celule animale

Obişnuit, în centrul celulei animale, se află nucleul care are rolul de coordonare a activității celulare. El este delimitat de cisterna perinucleară şi conține acizii nucleici conjugați cu proteinele.

Citoplasma este mărginită de membrana celulară şi învelişul nuclear şi este formată din matricea citoplasmatică sau hialoplasma sau citosolul, care înconjoară structuri cu organizare şi funcții caracteristice – organite celulare sau intracitoplasmatice – precum şi molecule ce se depozitează sub formă de incluziuni celulare.

2.2.3.2. MEMBRANA CELULARĂ

O caracteristică generală a tuturor celulelor este limitarea la exterior cu o membrană, numită membrană plasmatică. În plus, toate celulele eucariote

Scanned with OKEN Scanner

conţin un sistem complex de membrane interne care constă din variate membrane ce delimitează nucleul şi alte organite.

Membranele celulare sunt constituite din lipide şi proteine.

Membrana celulei sau *membrana plasmatică* serveşte ca interfaţă între mecanismele din interiorul celulei şi fluidul exterior care scaldă toate celulele. Ea este o peliculă foarte subţire şi flexibilă, care acoperă şi delimitează compartimentul citoplasmatic, controlează schimburile cu mediul înconjurător, se comportă ca un sistem de recepţie – transmitere şi constituie substratul adezivităţii celulare.

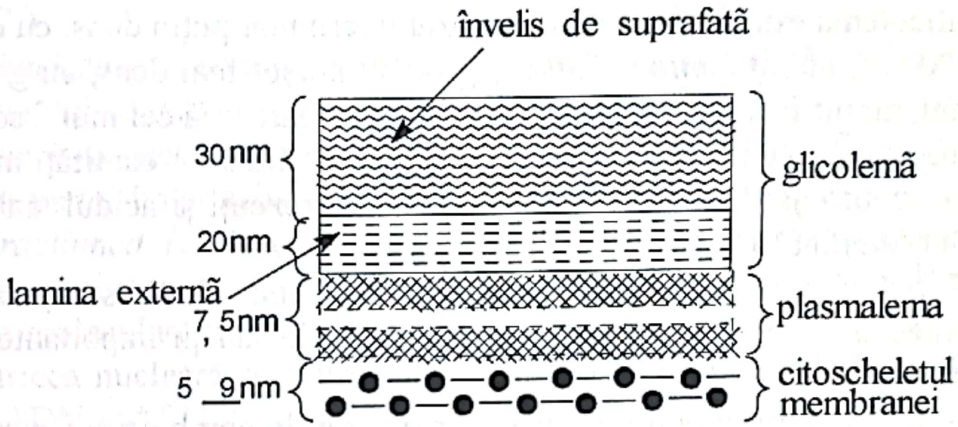


Fig. 2.6. Reprezentarea schematică a celor trei părţi componente ale membranei celulare

Membrana celulară este alcătuită din trei părţi componente principale (fig. 2.6) (2): 1. *plasmalema*, un complex lipidic gros de 7,5 nm ce formează baza organizării membranei; 2. *glicolema*, un complex glicoproteic superficial, o ţesătură fibrilară laxă, cu grosimea de 50 nm; 3. *citoscheletul membranei*, o reţea proteică aşezată pe faţa internă a plasmalemei. Membrana celulară conţine 70 % substanţe organice (proteine, lipide, glucide, lipoproteine, glicoproteine, fosfolipide, glicolipide, colesterol), urme de substanţe minerale şi 30 % apă.

Totalitatea lipidelor membranei celulare sunt localizate în plasmalemă, sub forma unei foiţe continui, hidrofobe. Lipidele din membrana plasmatică sunt, în primul rând, fosfolipide (mai ales, fosfatidil etanolamine) şi colesterol.

Glucidele sunt prezente în glicolemă, în stare liberă, sub formă de glicoproteine şi glicolipide sau necombinate.

În zonele hidrofile ale membranei, sunt ataşaţi ioni anorganici la moleculele organice, care, deşi se găsesc într-un procent foarte mic au un rol însemnat în biologia membranei celulare.

Scanned with OKEN Scanner

Plasmalema (citolema) este partea centrală a membranei celulare şi este alcătuită din lipide şi proteine. Interacţiile dintre moleculele lipidice şi proteice se produc prin legături electrostatice, legături van der Waals, hidrofobe şi de hidrogen.

Citoscheletul membranelor celulare, cu o grosime de 5 – 9 nm, constă dintr-o reţea proteică ce formează partea internă a membranei celulare, căreia îi conferă rezistenţă şi flexibilitate.

Glicolema reprezintă partea externă a membranei celulare, are o grosime de 50 nm, este de natură glicoproteică, este laxă şi conferă suprafeţei celulei o încărcare electrică negativă.

Glicolema este formată dintr-un strat intern mai puţin dens, cu o grosime de 20 nm, numit *lamina externă*, şi un strat uşor mai dens, cu grosimea de 30 nm, numit *înveliş de suprafaţă*. Galactoza participă cel mai frecvent la formarea glicoproteinelor din glicolemă şi sub forma unor cantităţi mai mici, manoza, fucoza şi glucoza. În glicolemă, sunt prezenţi şi acidul sialic, N – acetilglucozamina şi N – acetilgalactoza.

Prin membrana celulară, se realizează schimburi de substanţe între celulă şi mediul exterior, îndeplinindu-se următoarele funcţii importante pentru economia celulei:

– Se preia din mediul extracelular o serie de combustibili metabolici necesari menţinerii vieţii celulei şi activităţilor ei metabolice. În acelaşi timp, sunt eliminaţi prin membrană, în mediul extracelular, o serie de compuşi care nu sunt necesari celulei.

– Schimburile prin membrană reglează volumul celular, asigură menţinerea pH-ului intracelular şi compoziţia ionică la valori cât mai favorabile activităţii metabolice celulare.

2.2.3.3. NUCLEUL

Nucleul este organitul caracteristic celulelor eucariote şi îndeplineşte funcţiile de stocare a informaţiei genetice, de centru coordonator, de comandă şi control al activităţii celulare, funcţionând ca un computer chimic prevăzut cu un program (ADN) şi memorie (ARN) (2).

Ca centru informaţional, nucleul coordonează toate reacţiile chimice legate de desfăşurarea proceselor vitale, controlând sinteza enzimelor celulare şi organizarea celulei, prin controlul sintezei proteinelor de structură (2).

Scanned with OKEN Scanner

În compoziția nucleului, intră ADN, ARN, două tipuri de proteine (histone și nehistone), diferiți compuși fosfat organici și compuși anorganici. Lipidele și glucidele sunt în cantități foarte mici.

Obișnuit, o celulă are un nucleu, dar sunt și celule cu două sau mai multe nuclee. Forma nucleului este rotund–ovalară, alungită, turtită, lobată, urmând forma celulei din care face parte și are dimensiuni de 5 – 15 microni. Nucleul, de cele mai multe ori, este așezat în celulă în poziție centrală, dar sunt și numeroase excepții.

Matricea nucleară este scheletul de natură proteică care înglobează *cromatina* și *nucleolii* și care se sprijină, la exterior, pe *membrana nucleară* (fig. 2. 7.).

Matricea nucleară se compune din *matricea nucleară propriu-zisă* și *fracțiunea labilă a matricei*.

Matricea nucleară propriu-zisă este scheletul sau rețeaua formată, în cea mai mare parte, din proteine nehistonice cu masă moleculară mare și enzime.

Fracțiunea labilă a matricei este legată lax de matricea nucleară propriu-zisă și este alcătuită din proteine solubile, în mare parte, nehistonice, cu mase moleculare mici și alte molecule organice și anorganice. Enzimele din matricea nucleară sunt implicate în unele procese metabolice, inclusiv sinteza ADN și ARN.

Matricea nucleară este o rețea flexibilă care menține forma nucleului, poate modula flexibilitatea membranei nucleare, proprietate cu rol deosebit în transportul ARNr prin porii nucleari. Matricea nucleară prezintă contractilitate, influențată de ionii de Ca^{2+} și Mg^{2+}, care, în funcție de concentrația lor, pot modifica volumul nuclear. Volumul nuclear poate fi afectat și de conținutul nuclear în ADN.

Cromatina este materialul biologic intranuclear, care se colorează cu coloranții bazici. *Cromatina* și *cromozomii* sunt forma de organizare a materialului genetic (ADN). Cromatina este forma de existență interfazică (perioada dintre mitoze), iar cromozomii sunt forma de existență în timpul diviziunii indirecte. Cromatina poate fi considerată o nucleoproteină, în care proteinele histonice și nehistonice interacționează fiecare, atât între ele, cât și cu ADN-ul.

Cromatina, pe baza colorabilității cu coloranți bazici, dar și a funcționabilității, se clasifică în două categorii:

– *eucromatina*, care se colorează mai puțin intens, este *cromatina necondensată* și *transcriptibilă*;

– *heterocromatina*, care se colorează foarte intens, este *cromatina condensată* și *netranscriptibilă*.

Scanned with OKEN Scanner

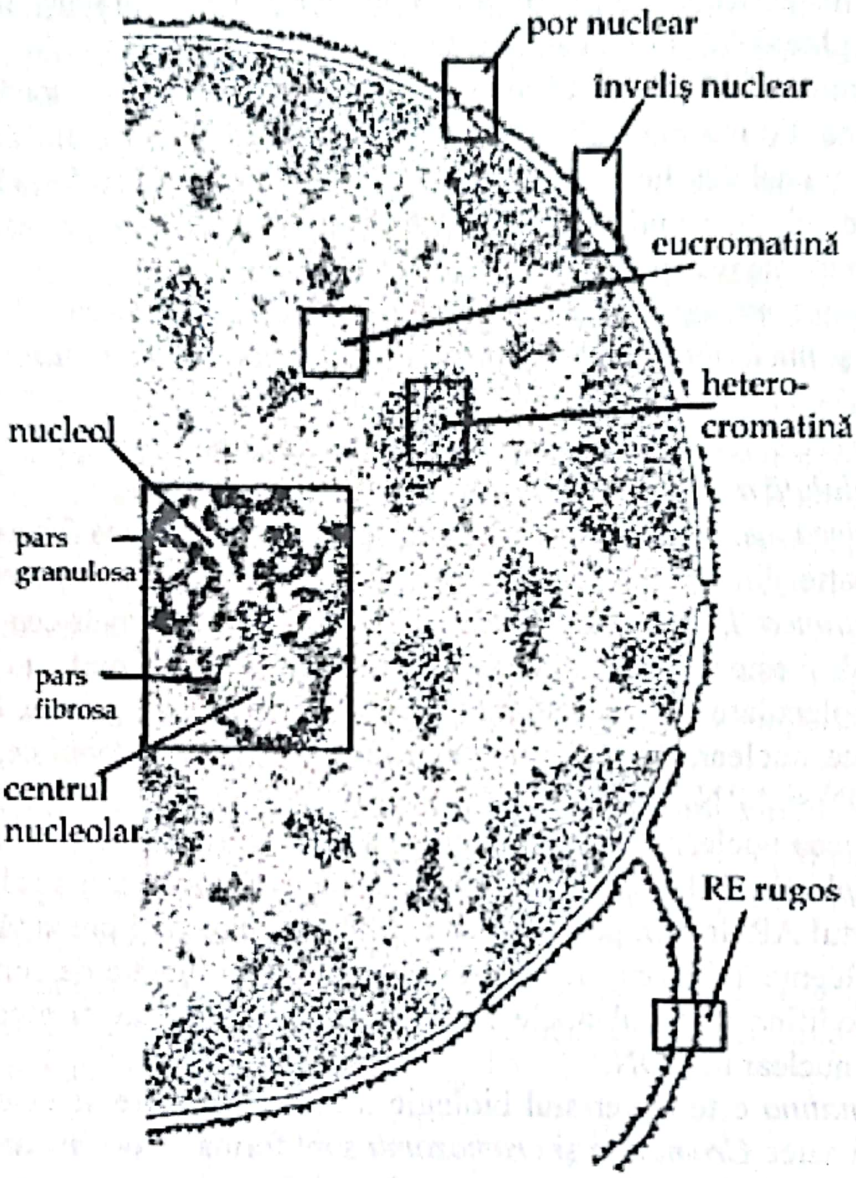


Fig. 2.7. Nucleu vizibil la microscopul electronic

Se remarcă nucleoplasma care cuprinde matricea nucleară, heterocromatina, eucromatina și nucleolul; membrana nucleară cu cisterna nucleară este întreruptă de complexe por din loc în loc; reticulul endoplasmatic rugos (UTMB).

Eucromatina este accesibilă ARN – polimerazei II pentru transcripție, iar heterocromatina nu permite accesul enzimei de transcripție. Eucromatina, purtătoare de gene structurale, este porțiunea funcțional activă a cromatinei, pe care se face transcripție.

Heterocromatina se găsește sub două forme: *constitutivă* și *facultativă*.

Scanned with OKEN Scanner

Heterocromatina constitutivă este condensată în interfază, este genetic inactivă, nu conține gene structurale și pe ea nu se face transcripție. *Heterocromatina facultativă* este o cromatină condensată, conține gene structurale care sunt inactive, adică nu se face transcripție pe ele.

Nucleii celulelor eucariote conțin, în funcție de specie, câțiva sau mai mulți *cromozomi*: 46 la om, 44 la iepure, 42 la șobolan, 34 la vulpe, 16 la albină etc. În alcătuirea fiecărui cromozom, intră câte o moleculă foarte mare de acid dezoxiribonucleic (ADN) drept component principal, acidul ribonucleic (ARN) și substanțe proteice histonice și nehistonice. Cromozomii sunt baza materială a eredității, fiecare cromozom fiind un grup ligaturat de gene.

În evoluția lor, cromozomii pot fi clasificați în *interfazici* și *mitotici*. Cromozomii pot fi studiați microscopic cel mai bine în cursul metafazei – așa numiții *cromozomi metafazici* (fig. 2.8.) (2).

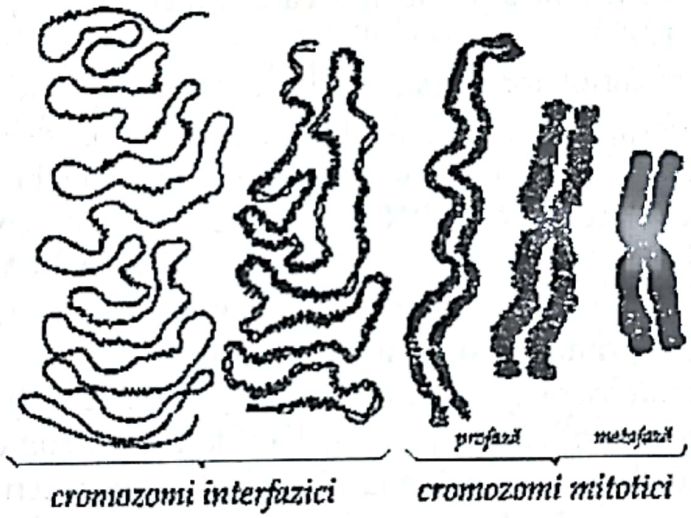


Fig. 2. 8. Cromozomi interfazici (necondensați) și cromozomi mitotici (condensați) (2)

Cromozomii umani cu diametrul de 1,5 – 10 microni au următoarele părți componente: *cromatide* cu două extremități terminale (*telomerele*), *centromer (constricția primară), constricțiile secundare* și *sateliții* (fig. 2.9.).

Un cromozom metafazic este format din două *cromatide*, care sunt două jumătăți longitudinale ale cromozomului, genetic identice.

Centromerul este locul de unire a *cromatidelor*.

Constricțiile secundare sunt prezente la nivelul brațelor cromozomiale, iar *sateliții* sunt mici proeminențe atașate brațelor scurte ale cromozomilor acrocentrici.

Scanned with OKEN Scanner

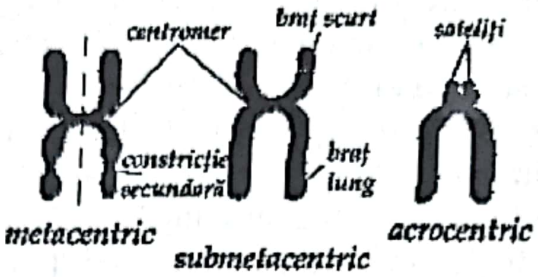


Fig. 2.9. Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de cromozomi metafazici. Linia întreruptă marchează planul de simetrie a cromozomilor care separă cele două cromatide (2)

Nucleolul este formaţiunea corpusculară intracelulară prezentă numai în interfază (perioada dintre mitoze), a cărei funcţie principală este biogeneza ribozomilor (2).

În nucleul eucariotelor, există unul sau mai mulţi nucleoli, cu diametrul de 1 – 2 μm, obişnuit de formă rotund–ovalară, este cea mai densă structură din celulă şi, în general, ocupă 3 – 4 % din volumul nucleului.

Nucleolul conţine ADN, ARN şi proteine. Există un conţinut mare de ARN, deoarece în nucleol se sintetizează ARN ribozomal (ARNr). Cea mai mare parte din proteinele nucleolare sunt enzimele implicate în metabolismul nucleolar şi, în primul rând, în sinteza ARNr.

Membrana nucleară este o structură lipoproteică cu o grosime de ordinul zecilor de nanomeri, care separă nucleul de citoplasma celulei. Ea este un sistem special de endomembrană alcătuit dintr-o cisternă perinucleară continuă, străbătută, din loc în loc, de nişte *pori (complexul por).*

În alcătuirea membranei nucleare, se distinge o membrană externă şi una internă, care împreună delimitează spaţiul perinuclear sau cisternal. Membrana nucleară conţine circa 70 % proteine, din care un procent important de enzime, circa 20 % lipide, din care 75 % sunt fosfolipide, în majoritate lecitină, fosfatidiletanolamină şi restul ADN şi ARN.

2.2.3.4. CITOPLASMA

Citoplasma, aşa cum s-a arătat mai sus, se găseşte în spaţiul celular dintre membrana celulară şi învelişul nuclear ocupat de *matricea citoplasmatică (hialoplasma sau citosolul)*, care înconjoară *organitele celulare*,

Scanned with OKEN Scanner

structuri cu organizare şi funcţii caracteristice. De asemenea, pot exista diferite molecule în exces care se depozitează, numite *incluziuni celulare*.

Matricea citoplasmatică văzută la microscopul luminiscent apare, de obicei, astructurată, cu grade diferite de acidofilie sau bazofilie. Ea este un gel vâscoelastic şi se prezintă ca o reţea microtrabeculară cu două faze: o structură tridimensională bogată în proteine structurale şi enzime şi o fază fluidă bogată în apă, ce se află în ochiurile reţelei microtrabeculare. În faza fluidă, se găsesc diferite molecule, precum substratele enzimelor matriciale, glucoză, aminoacizi, ioni şi gaze dizolvate (CO_2 şi O_2). La nivelul matricei citoplasmatice, se desfăşoară reacţiile glicolitice, activarea aminoacizilor, sintezele acizilor graşi, ai unor aminoacizi şi ai mononucleotidelor. În matricea citoplasmatică, unele proteine de tip contractil se organizează în mici filamente, care, împreună cu microtubulii, formează *citoscheletul matricial*, aflat în permanent proces de asamblare sau de dezagregare. Organitele celulare din matricea citoplasmatică se pot observa la microscopul luminiscent (*mitocondrii, complexul Golgi, centriolul celular, ergatoplasma*) şi altele se pot vedea numai cu microscopul electronic (*lizozomi, peroxizomi, reticulul endoplasmatic neted şi rugos, microfilamente, microtubuli, ribozomi*). Unele organite citoplasmatice nu sunt delimitate de endomembrane (*microtubuli, microfilamente, centrioli, ribozomi*) şi se află într-un permanent proces de polimerizare–depolimerizare, iar altele apar delimitate de endomembrane (*mitocondrii, complex Golgi, peroxizomi, reticul endoplasmatic*).

Microfilamentele, filamentele intermediare* şi *microtubulii sunt organitele mişcării celulare* şi constituie *citoscheletul.

Celulele conţin numeroase fibre proteice, fin elaborate, care servesc la stabilizarea conformaţiei celulei, asigură rezistenţa mecanică, locomoţia intracelulară a organitelor şi separarea cromozomilor în mitoză şi meioză.

Microfilamentele sunt prezente în citoplasma tuturor celulelor, dar mai numeroase sunt în acele celule care au accentuate mişcări de deplasare în ţesuturi sau mişcări intracitoplasmatice. Microfilamentele sunt constituite din substanţe proteice de tip actină şi miozină; au diametrul de 5 – 7 nm şi lungimi diferite. În citosol, se găsesc grupate sau izolate şi aşezate în direcţii diferite. În celulele nemusculare, microfilamentele sunt formate din *actină* şi mai puţin din *miozină*.

Filamentele intermediare sunt fibre citoplasmice, cu diametrul de circa 10 nm, se găsesc sub forma mai multor tipuri, fiecare constituit din una sau mai multe proteine: keratinele (circa 20 de tipuri) se formează în celulele

Scanned with OKEN Scanner

epiteliale, laminele nucleare care stabilizează membrana internă a membranei nucleare, neurofilamentele care consolidează axele lungi ale neuronilor etc.

O formă de organizare stabilă a microfilamentelor o reprezintă *microvalii*, care se prezintă ca formațiuni ale membranei celulare de suprafață, a unor celule foarte active în transportul celular. Microvalii se găsesc la *enterocite* (celule absorbante ce căptușesc intestinul) și la *nefrocite* (celule epiteliale absorbante din tubii uriniferi).

Microtubulii au formă de cilindri, cu diametrul de 20 – 30 nm, au lungime variabilă, care poate crește de 1 000 de ori când se mărește și grosimea lor și se găsesc în citoplasma celulelor animale și vegetale, grupați sau izolați. Microtubulii sunt constituiți dintr-un ansamblu de dimeri de α–tubulină și β–tubulină, molecule proteice (*tubuline*) cu diametrul de 5 nm (fig. 2.10.). Microtubulii participă la variate activități ale celulei. Ei sunt formațiuni labile, datorită moleculelor de tubulină, care se agregă și se dezagregă continuu în citoplasmă, în funcție de concentrația ionilor de calciu și a moleculelor de AMP ciclic din citosol.

Împreună cu microfilamentele, microtubulii au rol în formarea citoscheletului și prin aceasta contribuie la menținerea formei celulei. Microtubulii participă la mișcările celulare și intracelulare și sunt prezenți în structura *cililor* și *flagelilor.*

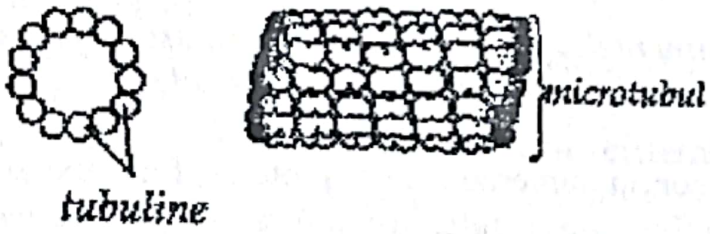


Fig. 2. 10. Organizarea tubulinelor în microtubuli (2)
(văzută la microscopul electronic)

Centriolii sunt organite microtubulare stabile, au diametrul de 0,15 microni și lungimea de 0,5 microni. Se găsesc localizați în componența *centrului celular* localizat frecvent lângă nucleu, adeseori în apropierea complexului Golgi. Centrul celular conține frecvent doi centrioli, care la microscopul electronic apar ca un cilindru perpendicular pe celălalt (fig. 2. 5.) și (fig. 2.11.) (2). Centrul celular este responsabil de inițierea și declanșarea diviziunii celulare (mitoza și meioza), formând *fusul de diviziune* (fig. 2.12.) (2).

Scanned with OKEN Scanner

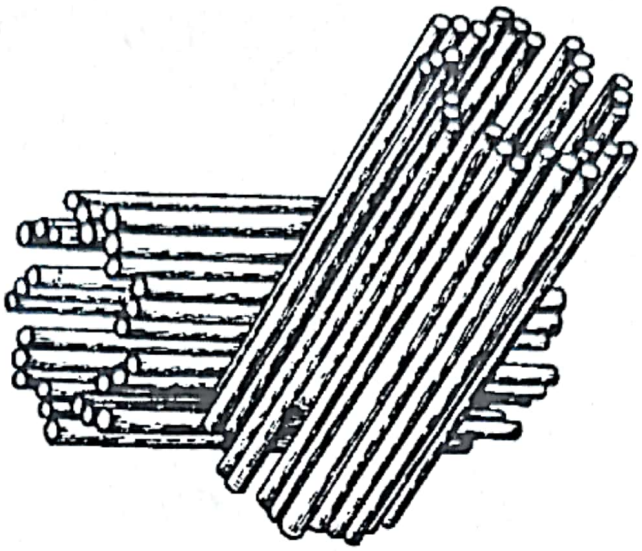


Fig. 2. 11. Centrioli (2)

În diviziunea celulară, centriolii se divid şi migrează la cei doi poli ai celulei. Între centrioli, se stabileşte o legătură din numeroşi microtubuli ce formează fusul de fuziune (centriol – centriol) (fig. 2.12.) (2).

Cilii şi *flagelii* sunt prelungiri celulare dispuse la unul din polii celulei şi asigură locomoția celulelor (exemplu, sperma) şi mişcarea lichidului celular. Ei sunt alcătuiți din microtubuli întregi şi incompleți. Cilul sau flagelul sunt constituiți dintr-o serie de câte 9 microtubuli aşezați în formă cilindrică, iar în mijlocul cilindrului, sunt plasați doi microtubuli simpli, formând, astfel, o structură numită „9 + 2". În fig. 2.13., este prezentată o secțiune transversală a unui cil, văzută la microscopul electronic.

Mitocondriile şi cloroplastele, organite generatoare de energie

Mitocondriile sunt prezente în toate celulele, cu excepția eritrocitelor adulte şi sunt răspândite în întreg citosolul. În celulele cu poli activi, acestea se concentrează în jurul acestora. Numărul mitocondriilor depinde de intensitatea activității celulelor. Cu cât o celulă este mai angajată funcțional, cu atât numărul mitocondriilor creşte, iar dimensiunea lor este mai mare. Hepatocitul poate avea 1 000 – 3 000 de mitocondrii în citosol.

În celulele animale, mitocondriile pot avea lungimea de până la 7 μm şi diametrul de 0,5 μm.

Mitocondria este formată dintr-*o membrană externă, o membrană internă* cu *criste mitocondriale*, *un spațiu extern* cuprins între cele două membrane şi *un spațiu intern* în interiorul membranei interne şi a cristelor (fig. 2.14 şi fig. 2.15) (2).

Scanned with OKEN Scanner

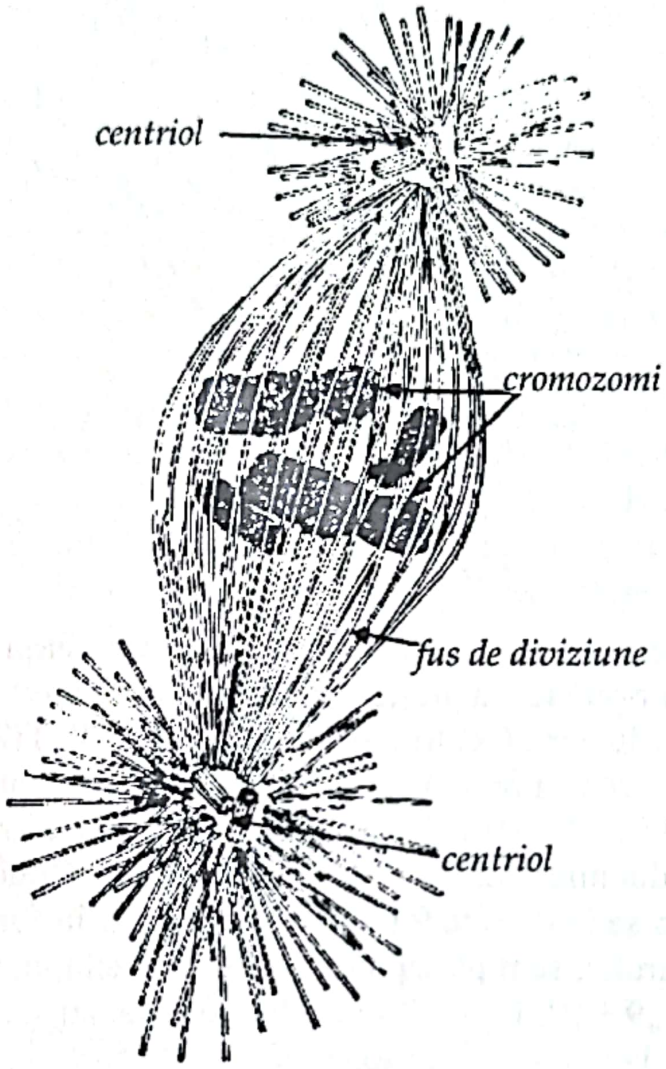


Fig. 2.12. Organizarea microtubulilor în fusul de diviziune (2)

Fig. 2.13. Secțiune transversală în cil văzută la microscopul electronic

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 2.14. Mitocondria

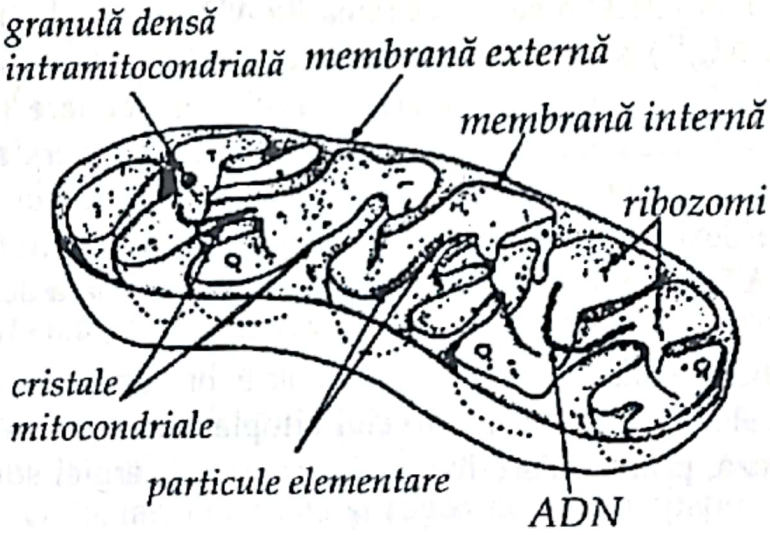


Fig. 2.15. Schema de organizare ultrastructurală a mitocondriei

Membrana externă are o grosime de circa 6 nm şi este formată din aproximativ 60 % proteine şi 40 % lipide, împreună cu un procent ridicat de colesterol şi puțin cardiolipin, care face ca membrana externă să fie permeabilă, prin ea realizându-se schimburile între citosol şi organit. Pe membrana externă, îşi desfăşoară activitatea o serie de enzime din clasele oxidoreductazelor, hidrolazelor şi ligazelor.

Scanned with OKEN Scanner

Membrana internă, groasă de aproximativ 6 nm, conține 80 % proteine și 20 % lipide (colesterol și cardiolipin). Colesterolul este mai puțin, iar cardiolipinul într-o cantitate mai mare, comparativ cu membrana externă, ceea ce face ca membrana internă să aibă o permeabilitate mai mică.

Prin membrana internă, trec în spațiul intern unii ioni și, mai ales, cei de calciu și magneziu, necesari activității enzimatice și, de asemenea, molecule de ADP și ATP, acizi grași și unii aminoacizi.

Cristele mitocondriale sunt structuri ce aparțin membranei interne.

În *spațiul extern*, cu o grosime de 7 – 8 nm, au loc schimburile continui între mitocondrie și citosol, prin intermediul membranei externe.

Spațiul intern (matricea mitocondrială) este format din proteine structurale, proteine contractile, enzime și acizii nucleici mitocondriali, ARM-mit (ARNr, ARNm și ARNt) și ADN-mit. Molecula de ADN mitocondrial (ADN-mit.) este bicatenară, helicoidală și circulară, spre deosebire de molecula de ADN din nucleu, care este bicatenară, helicoidală, dar liniară.

Compoziția chimică a mitocondriei, raportat la substanța uscată, este: 65 –70 % proteine, din care 30 % proteine structurale și 70 % enzime; 25 – 28 % lipide, 0,5 % ARN, o cantitate mică de ADN, glucide, ioni (mai ales, ioni de Ca^{2+} și Mg^{2+}) și apă. Mitocondria este organitul celular, la nivelul căruia se dezvoltă energia desfășurării activităților celulare (diviziune, secreție, contracție musculară, transmisie nervoasă etc.). Energia se realizează prin acțiunea enzimelor de oxido–reducere și prin procesul de fosforilare oxidativă ce se desfășoară la nivelul mitocondriei. Sub acțiunea ATP-azei, moleculele de ATP trec în ADP, eliberând energia necesară desfășurării proceselor vitale.

Cloroplastele sunt organite asemănătoare mitocondriei, care se găsesc în citosolul celulelor vegetale. La nivelul citoplastelor, se desfășoară procesul de fotosinteză, prin care are loc transformarea energiei solare în energie chimică.

Ribozomii, reticulul endoplasmatic și complexul Golgi sunt organite ale sintezei și secreției celulare.

Ribozomii se găsesc în citoplasma tuturor celulelor, cu excepția eritrocitelor, în stare liberă (individuali sau grupați – *polizomi* sau *poliribozomi*) și atașați de membranele reticulului endoplasmic. Numărul lor variază cu tipul de celulă și în funcție de perioadele funcționale ale acestora. În celulele secretorii, angajate în sinteza proteinelor, numărul ribozomilor este foarte mare.

Ribozomii au diametrul de 15 – 30 nm și o constantă de sedimentare de 80 S (S = Svedberg, unitate de sedimentare care este în funcție de mărimea moleculei). Ribozomul este format din două subunități: o subunitate mare cu diametrul de 30 nm, în formă sferică, turtită în partea dinspre sub-

Scanned with OKEN Scanner

unitatea mică care are diametrul de 10 – 20 nm şi este de formă alungită, concav – convexă (fig. 2.4.).

Ribozomii sunt formați din ARN, proteine, apă şi ioni metalici, mai ales, Ca^{2+} şi Mg^{2+}.

Polizomii sau *poliribozomii* se formează în momentul sintezei proteinelor. Numărul de ribozomi dintr-un polizom depinde de mărimea moleculei de proteină care se sintetizează. De exemplu, un polizom pentru colagen are 100 de ribozomi, iar pentru sinteza globinei din hemoglobină, 5 ribozomi.

Ribozomii sunt uniți între ei de către ARNm, formându-se lanțuri sinuoase. După ce proteina a fost sintetizată, lanțul polizomal se desface şi ribozomii se dispersează în citoplasmă.

Reticulul endoplasmic se găseşte în toate tipurile de celule, în afară de eritrocitele adulte şi este mai bine reprezentat în celulele angajate în sinteza proteinelor, glucidelor şi lipidelor.

Reticulul endoplasmic este format din saci, cisterne, tubi, vezicule anastomozate între ele (2). Aceste formațiuni sunt delimitate de o citomembrană groasă de circa 6 nm.

Sunt două tipuri de reticuli endoplasmici: *reticulul endoplasmic rugos* şi *reticulul endoplasmic neted.*

Reticulul endoplasmic rugos prezintă pe suprafața externă a membranei ribozomi atașați individual sau în grupuri active poliribozomale. Prin ribozomii atașați lui, conferă bazofilie puternică celulei respective (2). Reticulul endoplasmic rugos este organitul, la nivelul căruia se sintetizează proteinele de export, ca şi unele fosfolipide şi glicoproteine.

Reticulul endoplasmic neted este mai dezvoltat în celulele care sintetizează hormonii steroizi, glucide în cantitate mai mare, pigment. În celula musculară, reticulul endoplasmic neted are denumirea de *reticul sarcoplasmic* şi are un rol în cuplarea excitației de contracție.

Reticulii endoplasmici neted şi rugos ocupă un spațiu mare în celulă, aceasta permițând schimburi active pe mari porțiuni ale citomembranelor sale, între formațiunile componente şi citosol.

Reticulul endoplasmatic neted îndeplineşte în celule mai multe funcții în: sinteza hormonilor steroizi, trigliceridelor, a unor complecşi lipoproteici, în metabolismul lipidelor şi al glucidelor, în detoxifiere etc. În procesul de detoxifiere, reticulul endoplasmic neted desfăşoară acțiunea de metabolism a unor substanțe toxice prin enzime localizate în citomembranele sale, evitând, astfel, acumularea lor în citoplasmă.

Complexul Golgi este un organit prezent în toate celulele, în afară de eritrocitele adulte, sub diferite forme: rețea formată din canalicule anastomozate, vacuole de diferite mărimi, bastonaşe. În organizarea ultrastructurală a

Scanned with OKEN Scanner

complexului Golgi, intră pachete de saci turtiți sau cisterne așezate în stivă, microvezicule și macrovezicule, care sunt delimitate de citomembrane groase de 6 – 8 nm, netede, fără ribozomi atașați pe suprafața lor (fig. 2.16.) (2).

Complexul Golgi constă din proteine de structură și enzime în proporție de aproximativ 60 % , lipide și colesterol (40 %). Complexul Golgi participă la prelucrarea și transportul produsului secretat la nivelul reticulului endoplasmic către veziculele de secreție. El concentrează produsul de secreție primit de reticulul endoplasmic, îl maturează și îl împachetează în veziculele secretorii.

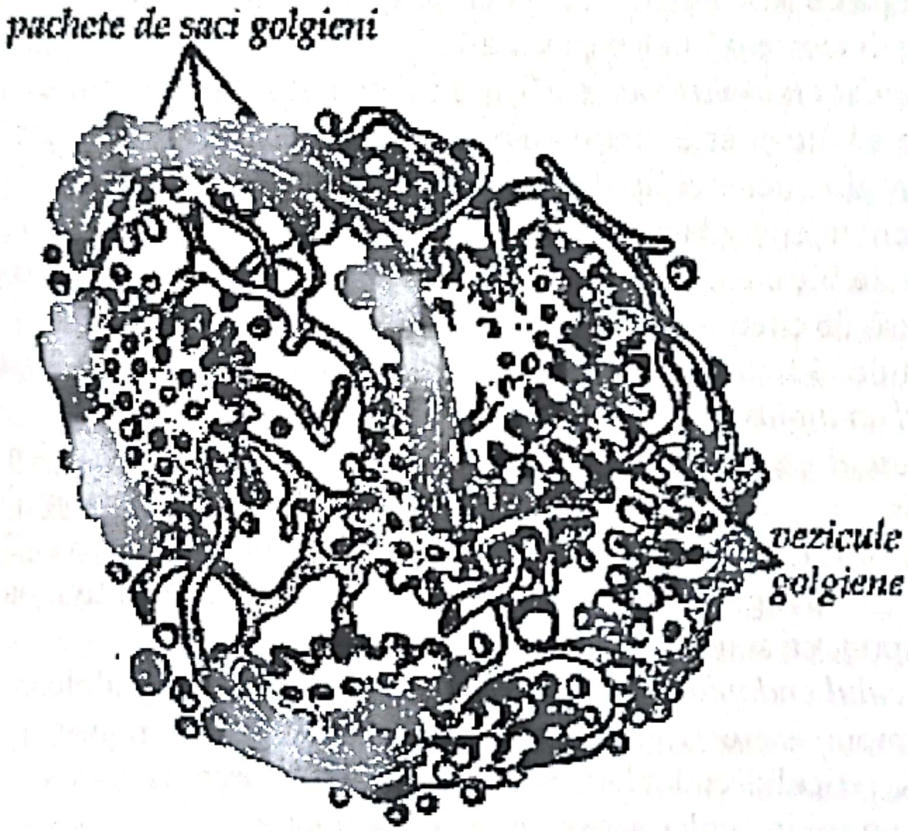


Fig. 2.16. Schema ultrastructurală a organizării complexului Golgi (2)

Complexul Golgi este implicat în sinteza glicoproteinelor. Componenta proteică primită de la reticulul endoplasmatic rugos se unește cu moleculele de hidrați de carbon de la nivelul structurilor golgiene. Procesul de legare a proteinelor de monozaharide în formațiunile golgiene se realizează enzimatic, cu participarea transferazelor, glucozamidazelor etc. În complexul Golgi, se desăvârșește procesul de glicozilare a glicoproteinelor prin legarea glucidelor terminale (N-acetilglucozamina, galactoza, fucoza, manoza, acidul sialic) la lanțurile oligozaharidelor care sunt N-glicozidic legate de glicoproteine (2).

Scanned with OKEN Scanner

Cu participarea sulfotransferazei golgiene, are loc procesul enzimatic de sulfatare a glicoproteinelor şi formarea proteoglicanilor sulfatați (condroitin-sulfații) şi a proteinelor sulfatate.

Lipidele sintetizate la nivelul reticulului endoplasmatic neted sunt transportate la complexul golgian, unde au loc procesele de maturare şi complexare cu proteinele.

Lizozomii şi peroxizomii sunt organitele digestiei intracelulare.

Lizozomii sunt de formă sferică sau ovoidală, au diametrul de 0,25 – 0,8 microni, sunt prezenți în toate celulele animale, cu excepția eritrocitelor adulte. Ei sunt alcătuiți dintr-o membrană delimitantă, simplă sau dublă şi o matrice lizozomală, care poate fi omogenă, fin granulată sau heterogenă.

Lizozomii conțin, în principal, un număr mare de hidrolaze acide (proteaze, peptidaze, nucleaze, fosfataze, lipaze, esteraze, glucozidaze).

PH-ul din interiorul lizozomului este de aproximativ 5, substanțial mai mic decât cel al citosolului (pH ≈ 7,2). Toate enzimele din lizozom lucrează bine la pH acid.

Lizozomii sunt organitele celulare responsabile de digestia intracelulară prin *heterofagie* şi *autofagie*.

Heterofagia este procesul de digestie intracelulară, cu ajutorul lizozomilor, a substanțelor nutritive, a bacteriilor, a virusurilor introduse în citoplasmă prin *endocitoză* şi *fagocitoză*.

Autofagia este procesul de digestie intracitoplasmatică, cu ajutorul enzimelor lizozomale, a organitelor celulare din celula respectivă, cum este mitocondria, care şi-au terminat activitatea şi sunt în diferite grade de dezintegrare.

Bolile cauzate de depozitarea lizozomală se datoresc acumulării în lizozomi a unor macromolecule (proteine, polizaharide, lipide), din cauza neajunsului genetic în producerea enzimelor necesare pentru degradare.

Neuronii sistemului nervos central sunt susceptibili la avarii (degradări, vătămări). Cele mai multe boli sunt cauzate de moştenirea a două alele imperfecte ale genei cu codificarea unu a enzimelor hidrolitice.

Exemple: – *Boala lui Gaucher* şi *Boala Tay – Sachs*, ambele sunt cauzate de lipsa producerii enzimelor necesare degradării sfingolipidelor, derivați de acizi graşi, prezente în toate membranele celulare.

Mucopolizaharidosis I. este cauzată de lipsa la sinteza enzimei α – L – *iduronidaza* necesară degradării proteoglicanilor, ca heparin sulfatul.

Peroxizomii sunt organite de digestie intracelulară, prezente în citosolul tuturor celulelor animale şi vegetale. Numărul lor diferă în funcție de tipul de celulă şi pot fi chiar mai numeroşi decât lizozomii. După mărimea lor,

Scanned with OKEN Scanner

se deosebesc *macroperoxizomii* cu diametrul de 0,5 – 1,5 μm şi *microperoxizomi* cu diametrul de 0,1 – 0,4 μm.

Peroxizomii au formă de vacuole sferice sau ovoide şi, uneori, de forme neregulate, cu o matrice fin granulară, sunt mărginiţi de o endomembrană a cărei compoziţie este asemănătoare cu a membranei reticulului endoplasmic, cu o grosime de 6,5 – 8 nm. Peroxizomii provin din reticulul endoplasmatic, nu din aparatul Golgi, care este sursa lizozomilor. Enzimele şi alte proteine destinate peroxizomilor sunt sintetizate în citoplasmă.

Peroxizomii conţin proteine, lipide şi enzime. Enzimele peroxizomilor diferă ca număr şi specificitate de la un tip de celulă la altul. Dintre enzimele prezente în peroxizomi, se menţionează *catalaza*, care este dominantă, *uratoxidaza*, *D-aminoacidoxidaza*, *enzimele din ciclul glioxalat* etc.

Câteva funcţii ale peroxizomilor în ficatul uman:

– scindează apa oxigenată, potenţialii produşi periculoşi pentru oxidarea acizilor graşi;

– descompun excesul de purine la acid uric;

– participă la sinteza acizilor biliari şi a colesterolului.

Citosolul acumulează diferiţi produşi ai metabolismului (glucide, lipide, proteine, pigmenţi, cristale) pe care îi depozitează temporar sau definitiv.

2.2.3.5. CICLUL CELULAR. PROLIFERAREA ŞI CREŞTEREA CELULELOR

Ciclul celular este perioada de timp de la terminarea diviziunii celulare când a luat naştere o celulă şi până în momentul în care s-a terminat diviziunea sa. Ciclul celular cuprinde două faze: *diviziunea celulară* (*M, mitoza*) şi *interfaza*, etapa dintre două diviziuni succesive. La interfază, în celulă este o activitate metabolică intensă, deoarece are loc sinteza majorităţii ADN, ARN şi a proteinelor. ARN şi proteinele se sintetizează pe toată perioada interfazei, iar ADN numai într-o anumită perioadă, *perioada sintetică* (S). Înaintea perioadei S există *o perioadă presintetică* (G_1) şi *o perioadă postsintetică* (G_2). În ambele perioade G, are loc şi o creştere accentuată a celulei.

Durata ciclului celular variază mult în funcţie de specie, tip de celulă etc. La o celulă de mamifer, în cultură, durata ciclului celular este de circa 16 ore, din care: M = 1 oră, S = 7 ore, G_1 = 5 ore şi G_2 = 3 ore (2).

Există o proteină care se acumulează în citoplasmă şi la o anumită concentraţie, determină iniţierea replicării ADN, deci trecerea celulei în perioada S.

Scanned with OKEN Scanner

După modul în care celulele parcurg ciclul celular, țesuturile se clasifică în trei categorii:

– țesuturi ale căror celule și-au pierdut capacitatea de a se divide (neuronii) în care celulele se opresc în faza G_1 a ciclului;

– țesuturi formate din celule cu mare capacitate de diviziune: măduva osoasă hematogenă, epidermul, epiteliul mucoasei intestinale, celulele liniei germinative spermatogene;

– țesuturi ale căror celule au o capacitate scăzută de a se divide, dar care, în anumite condiții, se divid rapid: hepatocitele, celulele glandelor endocrine.

Diviziunea celulară. Celulele tuturor viețuitoarelor se reproduc prin diviziune celulară, care constă în formarea dintr-o celulă a două celule fiice. Diviziunea celulară este etapa ciclului celular în care se produce o distribuire a materialului genetic la cele două celule fiice. Aceasta se poate realiza prin *diviziune directă* sau *amitoză* și *diviziune indirectă: mitoză* și *meioză.*

Amitoza sau *diviziunea directă*, considerată o formă inferioară de reproducere celulară, este mult întâlnită la organismele unicelulare. Este întâlnită și la metazoare, la mamifere și la om, în condiții patologice, în țesuturile pe cale de regenerare și în procesele tumorale.

Amitoza constă din strangularea sau fisurarea nucleului în două părți mai mult sau mai puțin egale, după care are loc împărțirea citoplasmei. Amitoza nu este un proces de reproducere a unor celule epuizate ca potențial genetic. În anumite condiții fiziologice, amitoza duce la un stoc de celule noi, capabile de a se diferenția într-un timp mai scurt decât mitoza.

Mitoza este întâlnită la toate celulele somatice, iar celulele fiice au același număr de cromozomi, ca și celulele mamă (sunt celule diploide).

Mitoza se desfășoară în patru faze succesive: *profaza, metafaza, anafaza* și *telofaza.* Adesea, se prezintă și a cincea fază, numită *prometafaza,* plasată între profază și metafază.

Durata mitozei la om este de circa 60 minute, iar fazele nu sunt egale: profaza durează 30 min., metafaza 8 min., anafaza 4 min. și telofaza 18 min. (2). Schema mitozei este dată în figura 2.17.

La profază, nucleul prezintă din ce în ce mai multe și mai mici granule de cromatină. Granulele, apoi, se condensează și se dispun sub formă de filament ca un ghem numit *spirem*. Lângă membrana nucleară, se individualizează progresiv cromozomii. Intrarea celulei în mitoză este indicată de existența a doi centrioli care se despart, având loc formarea fusului de diviziune, când centriolii migrează, unul spre un pol și celălalt spre polul opus al celulei, iar între ei se formează o serie de filamente constituite din tubuli ce dau aspect de fus. Unele filamente ale fusului se întind de la un centriol la altul

Scanned with OKEN Scanner

și poartă numele de filamente centriolo-centriolare, iar altele se întind de la un centriol la centromerul cromozomilor și se numesc filamente centriolo-crozomale.

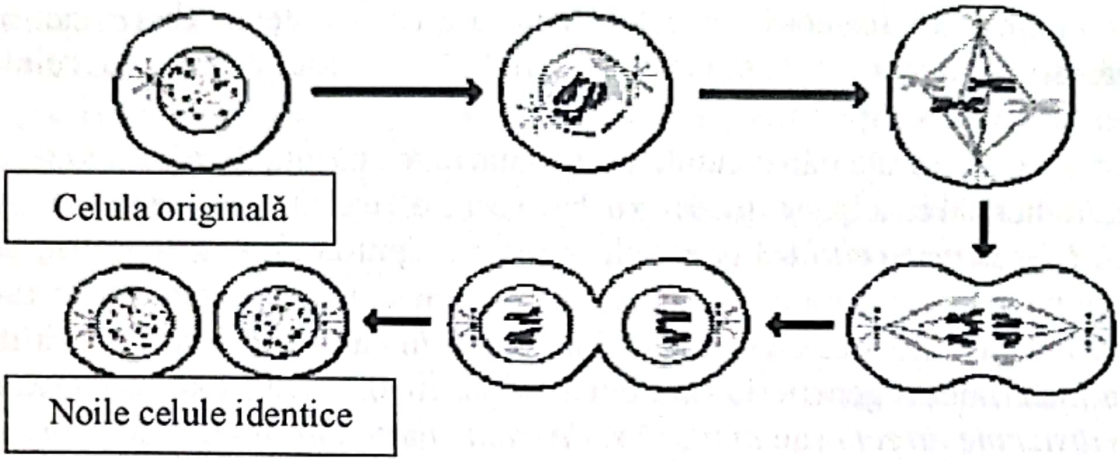


Fig. 2.17. Șase faze ale mitozei

Fusul poate fi distrus de o serie de medicamente împotriva cancerului. În felul acesta, nu mai are loc diviziunea celulară.

La prometafază, are loc dizolvarea membranei nucleare și deplasarea cromozomilor la nivelul plăcii ecuatoriale a fusului de diviziune.

În metafază, se produce clivarea longitudinală a cromozomilor și despărțirea celor două cromatide fiice.

La anafază, are loc deplasarea cromatidelor devenite cromozomii fii spre cei doi poli ai celulei. La om, din cei 92 de cromozomi, 46 de cromozomi se deplasează spre un pol al celulei, iar ceilalți 46 spre celălalt pol.

Telofaza începe când cele două grupe cromozomale au ajuns la polii celulari. Cromozomii, aparent, fuzionează în câte un spirem și în jurul lor se formează o membrană nucleară, iar spiremul se transformă într-o rețea de cromatină. Se formează doi nuclei. În același timp, se produce despicarea citoplasmei celulei la nivelul plăcii ecuatoriale; are loc fenomenul denumit *citodiereză* și rezultă două celule, fiecare având o cantitate de ADN egală cu cea a celulei mamă.

Meioza are loc în procesul maturării *gameților* (ovulul și spermatozoidul), celule haploide. Prin unirea ovulului cu spermatozoidul (gameții), se formează o celulă diploidă, *zigotul*. Înjumătățirea numărului de cromozomi la meioză se datorează faptului că aceasta este alcătuită din două diviziuni indirecte (meioza I și meioza II) (fig. 2.18.), iar între ele nu se mai produce sinteza ADN, așa cum s-a arătat mai înainte la ciclul celular.

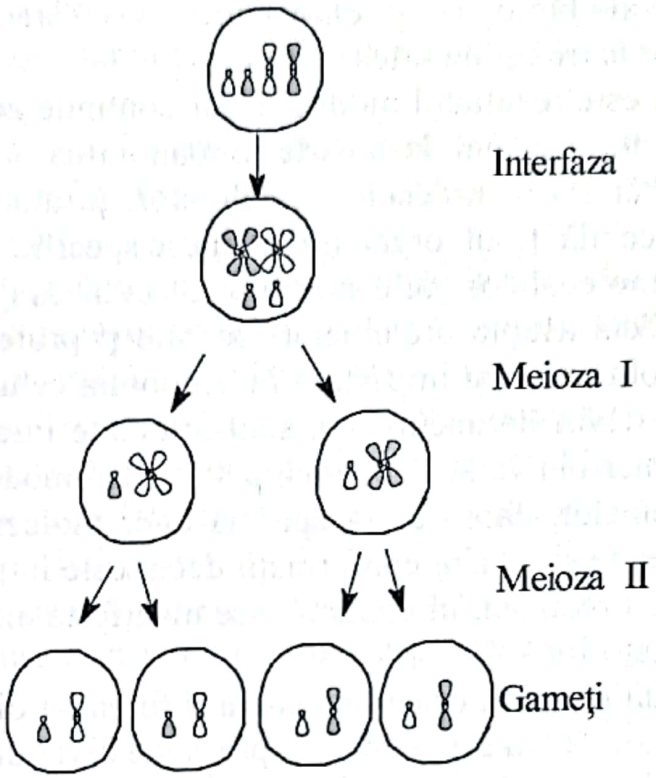


Fig. 2.18. Fazele majore ale meiozei

Meioza I este un proces complex, compus din cinci etape: *profaza I, prometafaza I, metafaza I, anafaza I* şi *telofaza I,* în urma cărora rezultă două celule haploide, nucleul fiecăreia conţine un set de cromozomi identici, care sunt formaţi, fiecare, din două cromatide. După meioza I, urmează o perioadă de interfază în care nu are loc replicarea ADN. Meioza II este o mitoză obişnuită, în care are loc separarea centromerelor ce unesc cromatidele surori.

2.2.3.6. CONSIDERAŢII GENERALE PRIVIND ÎMBĂTRÂNIREA

Organismul uman adult este constituit din câteva sute de tipuri diferite de celule. Toate aceste tipuri de celule deosebite ca formă, volum, compoziţie chimică şi funcţie, iau naştere dintr-o singură celulă, celula ou. Această diferenţiere este fenomenul cheie al apariţiei şi existenţei individului şi este implicată în: reproducerea (formarea de noi indivizi a unei specii), creşterea şi dezvoltarea organismului, regenerarea celulelor sau a ţesuturilor lezate sau uzate în cursul vieţii, evoluţia speciilor şi adaptarea organismului la me-

Scanned with OKEN Scanner

diu. Procesul diferențierii se desfășoară pe tot parcursul vieții individului și cuprinde trei perioade biologice: a. ontogeneza; b. creșterea, dezvoltarea și maturarea; c. îmbătrânirea și moartea.

Îmbătrânirea este rezultatul modificărilor continue acumulate în organismele vii, de la naștere până la moarte. Îmbătrânirea organismului uman este rezultatul îmbătrânirii moleculelor, celulelor, țesuturilor și organelor. Fiecare moleculă, celulă, țesut, organ îmbătrânesc specific.

Din rândul moleculelor, cele mai multe studii asupra procesului de îmbătrânire s-au făcut asupra proteinelor (enzime și proteine de structură), care, de fapt, au rolul cel mai important în economia celulelor. Când unele molecule proteice devin nefuncționale, sunt înlocuite imediat prin sinteză. Ca rezultat al înaintării în vârstă a celulei, pot surveni modificări în procesul de sinteză a proteinelor, care duc la apariția unor molecule cu proprietăți fizico-chimice diferite și cu alte conformații decât cele inițiale. La diferitele tipuri de celule din organism, îmbătrânirea se manifestă diferit asupra structurii și funcționalității lor.

Este acceptată ideea că orice tip celular diferențiat divizibil este capabil, în cursul vieții, să realizeze un număr precis de diviziuni programate genetic. Pentru astfel de celule, îmbătrânirea înseamnă scăderea ritmului procesului de diviziune, chiar și oprirea completă a acestui proces. Pentru celulele indivizibile în cursul vieții, cum sunt celulele musculare, neuronii, îmbătrânirea înseamnă acumularea de macromolecule cu proprietăți diferite de cele inițiale sau acumularea de substanțe nedegradabile.

Îmbătrânirea tisulară și a organelor este considerată ca rezultat al îmbătrânirii moleculelor, al celulelor și a modificării compoziției matricei intercelulare.

2.3. ȚESUTURILE

La vertebrate, celulele germinative din glandele sexuale, după fecundație, în urma unor procese complexe, în care au loc multiplicări, diviziuni și diferențieri, se ajunge la formarea foițelor embrionare: *ectoblast, endoblast și mezoblast.* Această transformare specifică, în vederea dobândirii unor funcții necesare organismului nou format, este numită *citodiferențiere.*

În stadiul de dezvoltare embrionară a animalelor pluricelulare, rezultat din segmentarea oului *(blastulă),* diferențierea este evidentă când celulele sferice sau poliedrice devin prismatice și iau caractere de epiteliu. Diferențierea avansează în stadiul de *gastrulă* (stadiu de dezvoltare embrionară,

Scanned with OKEN Scanner

când blastula se transformă în gastrulă), o formă de sac, cu peretele format din cele trei foițe embrionare: *ectoderm, endoderm și mezoderm*, când celulele endodermale își asumă funcții digestive și vor forma organe cu funcție de nutriție.

Ectodermul se va diferenția în organe de protecție și de simț. *Mezodermul* și *mezenchimul* se vor diferenția în celule contractile, celule de susținere, celule excretoare.

Mezenchimul este țesutul conjunctiv embrionar din care este alcătuită cea mai mare parte a mezodermului. Vasele sanguine, vasele limfatice, țesutul conjunctiv se formează din mezenchim.

Diferențierea fiecărei categorii de celule derivate din foițele blastodermice are loc treptat, în timpul evoluției embrionare, așa încât, la sfârșitul diferențierii, ele vor avea structura specifică și caracteristică, în raport cu funcția pe care o vor îndeplini (3).

Procesul de diferențiere celulară se datorează, în principal, sintezei proteinelor structurale, a unor enzime, a proceselor metabolice și a unor factori externi.

Sub denumirea de *țesut*, se înțelege o grupă de celule ale organismului care au aceeași origine, îndeplinesc aceleași funcții și au aceeași structură. Țesuturile mai conțin și *o substanță intercelulară (substanța fundamentală)* a cărei natură și proprietăți sunt specifice fiecărui țesut. La unele țesuturi, substanța intercelulară este în cantitate foarte mică (țesutul epitelial), la altele este în cantitate mare (țesutul conjunctiv), motiv pentru care celulele țesutului sunt distanțate între ele.

Țesuturile nu au, în organism, un caracter independent; ele se asociază în vederea îndeplinirii anumitor funcții, formând organele. Țesuturile care alcătuiesc diversele organe nu au aceeași importanță funcțională. Funcțiile caracteristice organului sunt îndeplinite de unul din țesuturile participante, care reprezintă țesutul dominant sau specific. În cazul dermului, de exemplu, țesutul dominant este țesutul conjunctiv.

În raport cu caracterele funcționale și morfologice ale celulelor constitutive, se deosebesc cinci categorii de țesuturi (3):

1. *țesuturi epiteliale*;
2. *țesuturi conjunctive* cu derivatele lor metaplaziate *(cartilaginos* și *osos)*;
3. *țesutul muscular;*
4. *țesutul nervos;*
5. *țesutul sanguin* și *limfatic.*

Avându-se în vedere conținutul acestui tratat, autorii consideră firesc ca țesuturile muscular, nervos, sanguin și limfatic să se trateze foarte succint, limitându-se numai la definirea lor.

Scanned with OKEN Scanner

2.3.1. ȚESUTURILE EPITELIALE

Țesuturile epiteliale provin din toate cele trei foițe embrionare primitive: ectodermul, mezodermul și endodermul. Ele separă mediul extern de mediul intern și asigură compartimentarea mediului intern în domenii de compoziție distinctă. De asemenea, realizează legătura selectivă dintre compartimente. Pentru îndeplinirea acestor funcții, epiteliile sunt constituite din straturi continue de celule poliedrice strâns atașate între ele, cu puțină substanță intercelulară, acoperind suprafața corpului și căptușind cavitățile.

Citoplasma celulelor epiteliale conține un tip specific de proteine, numite *citokeratine*.

Epiteliile sunt țesuturi diverse din punct de vedere histogenetic și structural și realizează menținerea în limite foarte strânse a diferitelor constante ale mediului intern ale organismului, asigură constanța fizico-chimică a umorilor organismului, fără să fie influențate de modificările mediului extern.

Toate epiteliile au o față așezată pe o membrană bazală, iar o alta, marginea lor apicală, prezintă specializări de suprafață.

Membranele epiteliale, împreună cu glandele care se dezvoltă din acestea, constituie țesuturile epiteliale. *Mezoteliile* sunt membranele epiteliale care delimitează cavitățile: abdominală, pleurală și pericardică, iar *endoteliile* sunt membranele epiteliale din interiorul cordului, vaselor sanguine și vaselor limfatice.

Așa cum s-a menționat mai sus, epiteliile derivă din ectoderm, mezoderm și endoderm.

Ectodermul dă naștere la: a. epiderm cu toate derivatele sale (fire de păr, unghii, glande sudoripare, glande sebacee), parenchimul și ductele glandei mamare; b. epiteliul senzorial al urechii interne, retina, mucoasa olfactivă; c. glanda pituitară; d. medulosuprarenala; e. epiteliul cornean, epiteliul cristalinian; f. organul smalțului și smalțul dintelui (4).

Mezodermul dă naștere la: a. epiteliile rinichiului și ale gonadelor; b. epiteliul care căptușește cavitatea pericardică pleurală și peritoneală (mezoteliu); c. epiteliul care căptușește vasele sanguine și limfatice (endoteliu); d. corticosuprarenala.

Endodermul dă naștere la: a. epiteliul sistemului respirator, cu excepția mucoasei nazale de origine ectodermică; b. epiteliul tubului digestiv, cu excepția cavității bucale și a canalului anal, care sunt de origine ectodermică; c. epiteliul tuturor organelor și glandelor asociate tubului digestiv (ficat,

Scanned with OKEN Scanner

pancreas, veziculă biliară); d. glanda tiroidă, glanda paratiroidă; e. epiteliul cavităţii timpanice şi al tubei auditive; f. epiteliul timusului.

Funcţiile îndeplinite de epitelii sunt: a. acoperirea suprafeţei corpului (epidermul) şi căptuşirea cavităţilor (exemplu, epiteliul organelor cavitare); b. transportul selectiv de substanţe (exemple, epiteliul intestinal, epiteliul alveolar, epiteliul urinar); c. secreţia exocrină şi endocrină (glandele exocrine şi endocrine); d. recepţia senzorială (exemple, epiteliul olfactiv, mugurii gustativi); e. contractibilitatea (celulele mioepiteliale) (4).

După structura şi funcţia lor dominantă epiteliile se pot împărţi în două grupe principale: *epitelii de acoperire* şi *epitelii glandulare.* Aceasta este o clasificare arbitrară, deoarece există epitelii de acoperire, a căror celule secretă mucus (epiteliul gastric) sau epitelii în care celulele glandulare sunt dispersate (epiteliul intestinal, epiteliul traheal).

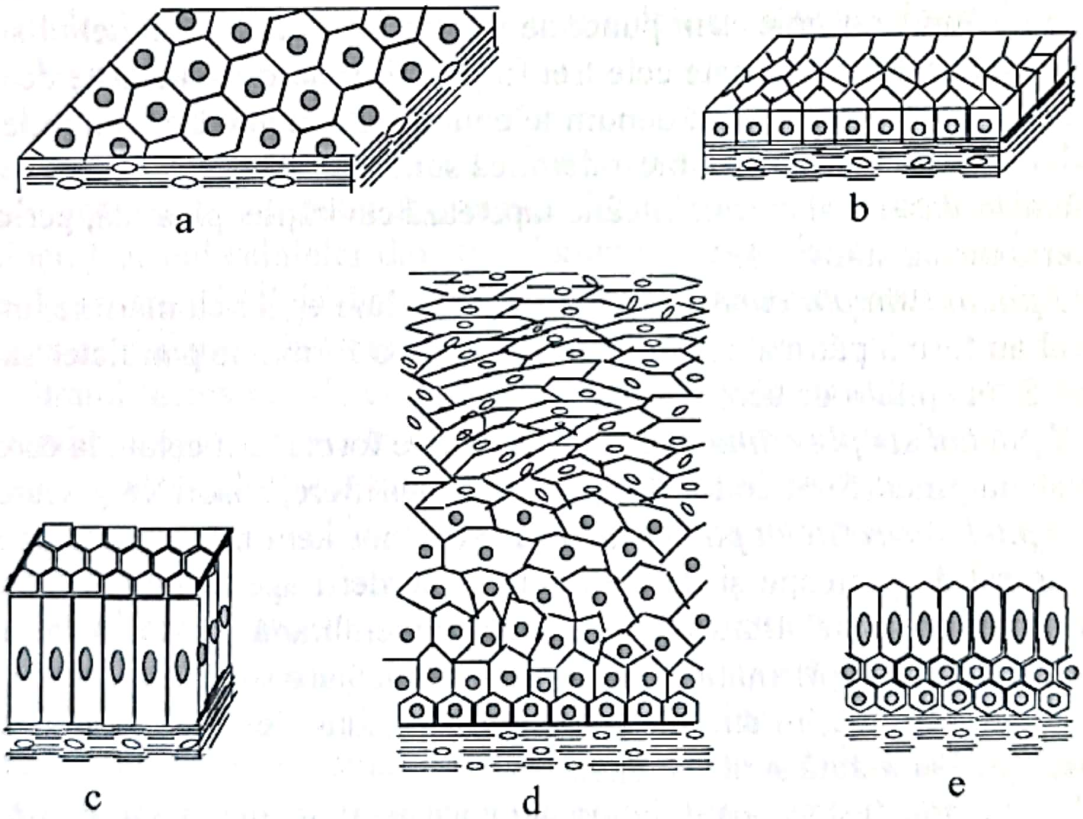


Fig. 2.19. Diagrama epiteliilor de înveliş şi căptuşire.
a. epiteliu simplu pavimentos; b. epiteliu simplu cubic;
c. epiteliu simplu cubic sau prismatic; d. epiteliu stratificat pavimentos;
e. epiteliu stratificat cilindric sau prismatic (5)

Scanned with OKEN Scanner

Epiteliile de acoperire sunt țesuturi formate din celule așezate în straturi care acoperă suprafața corpului și căptușesc cavitățile sale. Aceste țesuturi sunt alcătuite dintr-un strat de celule, numite *epitelii simple* și din mai multe straturi de celule cu înălțimi diferite, numite *epitelii stratificate* (fig. 2.19).

Epiteliile de acoperire simple, după forma celulelor care le compun, sunt: *pavimentoase sau scuamoase, cubice, cilindrice, prismatice.*

Epiteliile pseudostratificate sunt formate dintr-un singur rând de celule dispuse, toate, pe membrana bazală, dar au înălțimi variate, au nucleii la diferite niveluri și nu toate celulele ajung la suprafață, cauze care duc la impresia că sunt două straturi de celule.

Epiteliile de acoperire stratificate, formate din două sau mai multe straturi de celule se împart în: pavimentoase (scuamoase) keratinizate sau nekeratinizate, cubice, cilindrice sau prismatice și tranziționale.

Epiteliul simplu pavimentos este format din celule poliedrice turtite, așezate într-un strat unic. Din punct de vedere histogenetic, epiteliul simplu pavimentos provine din toate cele trei foițe embrionare. Structurile de origine ecto- și endodermică sunt denumite epitelii pavimentoase; epiteliile simple pavimentoase de origine mezodermică sunt numite *endotelii* când căptușesc lamina vaselor și *mezotelii* când tapetează cavitățile: pleurală, pericardială, peritoneală, sinovială.

Epiteliul simplu cubic este format din celule egale ca mărime, în plan vertical au formă pătrată, iar în plan orizontal, o formă de patrulater sau hexagon. Sunt epitelii de acoperire și secreție.

Epiteliul simplu cilindric și *prismatic* este format din celule la care predomină înălțimea. Sunt epitelii de protecție, lubrifiere, absorbție și secreție.

Epiteliul stratificat pavimentos sau scuamos keratinizat este epidermul care are rol de protecție și de prevenire a pierderii apei. Celulele sale sunt așezate pe mai multe straturi: celulele de pe membrana bazală au formă cubică, cilindrică sau prismatică; straturile intermediare sunt formate din celulele poliedrice, care, în straturile dinspre suprafață, devin din ce în ce mai turtite, iar la suprafață sunt scuamoase.

Epidermul este constituit din straturi celulare în număr variabil, în funcție de regiunea corpului, dar au aceeași evoluție histofiziologică. Se formează straturi ordonate, alcătuite, în principal, din celule denumite *keratinocite*. În epiderm, pe lângă keratinocite, se mai află alte trei tipuri de celule, reduse ca număr, care nu influențează stratificarea epidermului: *melanocte, celule Langerhans* și *celule Merkel.*

Epidermul este compus din cinci straturi de celule: *germinativ, spinos, granulos, lucios* și *cornos.*

Scanned with OKEN Scanner

Stratul germinativ sau bazal este cel mai profund strat al epidermului. El este așezat pe membrana bazală și este alcătuit din celule cubice sau cilindrice (prismatice). Din celulele acestui strat, iau naștere, prin mitoză, noi keratinocite, care, pe măsură ce încep să se diferențieze, trec în straturile următoare. Celulele din stratul germinativ sunt legate de membrana bazală prin intermediul hemidesmozomilor, iar între ele, prin desmozomi.

Stratul spinos este constituit din mai multe rânduri de celule poliedrice. Între celulele stratului spinos, sunt spații umplute cu substanță intercelulară, mai ales complexe moleculare glicoproteice, care mai este prezentă și în stratul următor (stratul granulos), acolo unde nu a avut loc procesul de keratinizare. Pe măsură ce procesul de keratinizare avansează, spațiile intercelulare dispar, iar celulele keratinizate ale epidermului se prezintă lipite unele de altele. Existența spațiilor intercelulare în straturile nekeratinizate face ca legătura între celule să se facă prin intermediul numeroșilor desmozomi, ca punți de legătură, la care se atașează fasciculele de tonofibrile ce dau aspect spinos keratinocitelor acestui strat.

Stratul granulos este alcătuit din 1 – 5 rânduri de celule turtite care conțin granule mari cromofile, cu afinitate pentru coloranții bazici. Aceste granule constau din substanță proteică denumită keratohialină, precursorul keratinei. Nucleul celulelor din stratul granulos este zbârcit și prezintă semne de degradare. Celulele din partea superioară a stratului granulos se apropie din ce în ce mai mult de forma celor din stratul cornos.

Stratul lucios se află deasupra stratului granulos și este format din câteva rânduri de celule puternic turtite, în care nu se mai regăsesc granulele bazofile. Aceste celule constau din membrana celulară îngroșată, care delimitează keratina fibroasă complexată cu proteina amorfă care și-a pierdut bazofilia.

Stratul cornos sau stratul keratinos de la suprafața epidermului conține celule în stare turtită, anucleate și cu o citoplasmă care conține o scleroproteină filamentoasă, birefringentă denumită *keratină* și cu membrana îngroșată, de circa 15 nm. Aceste keratinocite sunt cunoscute sub denumirea de *celule cornoase* sau *corneocite*. Corneocitele sunt solidarizate printr-un material intercelular sintetizat în paralel cu keratina (fig. 2.20)

Epiteliul stratificat pavimentos mucos delimitează cavitățile umede (cavitatea bucală, esofagul, cavitatea vaginală). Epiteliul stratificat mucos, din punct de vedere structural, este identic cu epiteliul stratificat keratinizat, cu deosebirea că celulele de la suprafață mor, fără a se keratiniza și se exfoliază.

Epiteliile glandulare au ca rol principal secreția.

Scanned with OKEN Scanner

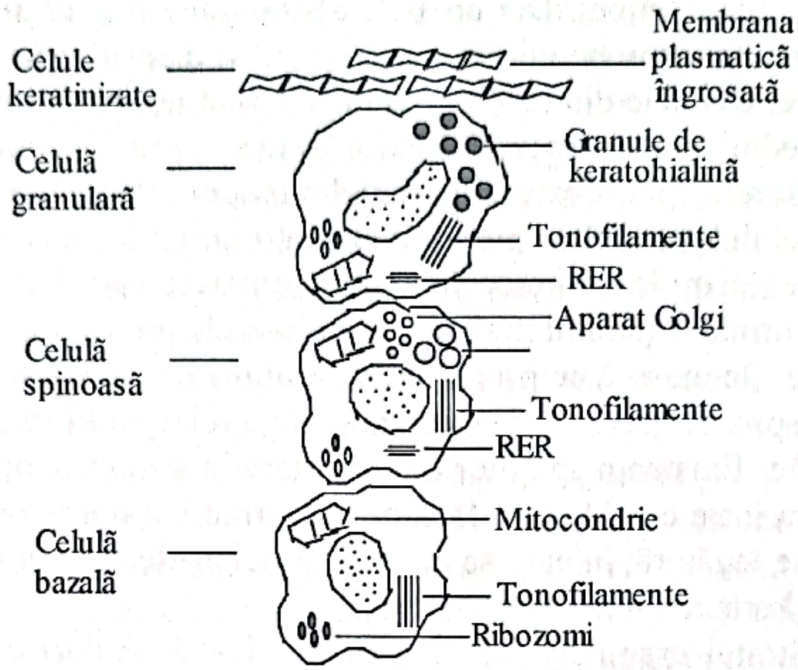


Fig. 2.20. Schema keratinocilelor epidermice

Caracteristici generale ale ţesuturilor epiteliale. Dimensiunile şi formele celulelor epiteliale variază de la înalte, cilindrice sau prismatice la cubice şi celule scuamoase sau pavimentoase. Ele sunt poliedrice datorită juxtapunerii lor în straturi sau lame. Forma nucleului (sferică, eliptică, alungită) corespunde, obişnuit, formei celulei. Ţesuturile epiteliale au o suprafaţă externă (către exteriorul corpului sau către lumenul cavităţii organismului) şi o suprafaţă internă (către mediul intern, adică spre ţesutul conjunctiv care are vase sanguine). Faţa internă a epiteliilor este aşezată pe o membrană bazală.

Epiteliile sunt alcătuite aproape numai din mase compacte de celule, între care nu există spaţii intercelulare observabile la microscopul optic şi nici vase sanguine. Celulele sunt unite împreună pe baza adezivităţii simple faţă de matricea extracelulară sau membranele bazale sau faţă de alte celule, prin intermediul suprafeţelor celulare adiacente sau a adezivităţii prin joncţiuni speciale între celule sau celule şi membrana bazală.

Celulele epiteliale sintetizează şi eliberează în matricea extracelulară mici cantităţi de colagen tip IV, V şi VI. Colagenul de tip IV şi V se găseşte în cantităţi mai mari în membranele bazale. Moleculele de colagen tip VI nu se agregă între ele şi se găsesc dispersate în matricea extracelulară (4).

Toate ţesuturile epiteliale prezintă pe suprafaţa lor bazală, în contact cu ţesutul conjunctiv subiacent, o structură lamelară fină, polizaharidică a

Scanned with OKEN Scanner

matricei extracelulare care este membrana bazală. Ea cimentează baza epiteliilor şi se asociază cu o tramă reticulară fină care marchează tranziția la matricea țesutului conjunctiv.

În membranele bazale, au fost identificate mai multe tipuri de molecule organice, printre care: colagen tip IV şi V, sulfatul de heparan, fibronectina, laminina, antigenul penfigoid bulos, amiloidul P etc.

La microscopul electronic, membrana bazală apare ca o structură matricială fină prezentă pe fața internă a tuturor țesuturilor epiteliale, separându-le de țesutul conjunctiv subiacent. La microscopul electronic, se disting trei straturi lamelare suprapuse. Primul strat cu o grosime de 10 nm, *lamina lucida*, este adiacentă celulelor epiteliale, apare omogenă şi traversată de rare filamente fine; stratul median al membranei bazale, cu o grosime de 20 – 30 nm, denumit *lamina densa,* este constituit din filamente fine, abundente, înglobate într-o matrice amorfă densă; ultimul strat, *lamina fibroreticularis*, care face tranziția la matricea țesutului conjunctiv.

În membranele bazale, au fost identificate mai multe tipuri de molecule organice, printre care: colagen tip IV şi colagen tip V. Un component major este colagenul tip IV localizat, mai ales, în *lamina densa*.

Celulele țesuturilor epiteliale sunt într-un proces de reînnoire permanentă şi sunt supuse unor mari variații de structură şi arhitectură. Histologic, sunt aşezate strâns unele de altele.

Un rol deosebit de important pentru adezivitatea celulelor epiteliale îl au glicoproteinele matricei intercelulare, *fibronectina* şi *laminina*, care se leagă de suprafața celulei, pe de o parte, şi pe de altă parte, de colagenele tip I, II, III, IV, V şi de alte molecule extracelulare (heparină, acid hialuronic, actină etc.).

Colagenul este secretat de celulele conjunctine, epiteliale, musculare, sub forma unor molecule glicoproteice precursoare, *procolagenii.* După descărcarea secreției în mediul extracelular, moleculele de procolagen trec prin proteoliză enzimatică în molecule de colagen (tropocolagen), capabile să polimerizeze în fibrile de colagen, ce rămân ca atare în substanța fundamentală sau intră în componența fibrelor, fie ca rețele fibrilare ce intră în constituția membranelor fibrilare.

Fibronectina este o glicoproteină care se găseşte pe suprafața celulară, în matricea extracelulară (inclusiv membranele celulare) şi în plasma sanguină. Fibronectina este sintetizată de o mare varietate de tipuri de celule, inclusiv fibroblastele şi unele celule epiteliale. Fibronectina plasmatică este sintetizată de hepatocite. Fibronectinele sunt compuse din subunități polipeptidice similare, cu masa moleculară de 220 000 – 250 000 daltoni fiecare, legate prin legături disulfidice în dimeri sau polimeri. De polipeptide sunt

Scanned with OKEN Scanner

legate covalent oligozaharide liniare sau ramificate, care conțin între 2 și 12 monozaharide. Cel mai adesea, monozaharidul terminal este acidul sialic (acid N–acetilneuraminic).

Laminina, o glicoproteină ce este localizată în *lamina rara* a membranei bazale, în imediata apropiere a celulelor, contribuind la interacțiunea celulelor epiteliale cu membrana bazală. Partea proteică este formată din trei lanțuri α–polipeptidice cu masa moleculară de 200 000 daltoni fiecare și un lanț β–polipeptidic cu masa moleculară de 400 000 daltoni, legate covalent la un capăt prin punți disulfidice. Laminina conține 12 – 15 % hidrați de carbon, în cea mai mare parte, oligozaharide legate de asparagină. Laminina intermediază atașarea celulelor epiteliale de colagenul tip IV din membrana bazală. Laminina se leagă cu heparina și sulfatul de heparan, care se găsesc în cantitate mare în membrana bazală.

Condronectina este o glicoproteină serică care mediază specific atașarea condrocitelor de colagenul tip II din cartilaj și demonstrează o atașare minimă pentru celulele epiteliale și fibroblaști.

În urma studiului la microscopul electronic, se constată existența a numeroase dispozitive speciale de legătură intercelulară, care permit ca celulele epiteliale să fie menținute strâns atașate. Prezența și numărul acestor dispozitive joncționale speciale reflectă gradul de solicitare mecanică la care un anumit epiteliu este supus. Reînnoirea permanentă, care are loc în țesuturile epiteliale, implică o regenerare celulară sincronă, care, la rândul său, necesită comunicații între celulele alăturate, în scopul reglării diviziunilor și diferențierii celulelor progenitoare și conservării celulelor precursoare. În epiteliile simple, cum este epiteliul intestinal, trebuie ca spațiile intercelulare să fie complet închise, pentru a împiedica pierderea de fluid interstițial din țesutul conjunctiv subiacent, precum și pentru a evita pătrunderea în organism a unor bacterii din lumenul intestinal. În condițiile regenerării epiteliale normale, joncțiunile intercelulare speciale iau naștere și evoluează odată cu celulele. Această evoluție începe cu formarea dispozitivelor speciale joncționale în stratul bazal al epiteliilor pluristratificate sau pe laturile celulelor din epiteliile simple și se sfârșește prin degenerarea joncțiunilor, odată cu exfolierea celule-lor îmbătrânite (4).

Dispozitivele joncționale speciale se împart în trei categorii funcționale:

a) dispozitive joncționale de adezivitate, care asigură aderarea mecanică a celulelor;

b) dispozitive joncționale impermeabile, care leagă celulele între ele și asigură etanșarea epiteliilor;

c) dispozitive joncționale de comunicare care mediază trecerea unor molecule mici de la o celulă la alta.

Scanned with OKEN Scanner

Dispozitivele joncționale de adezivitate sunt *desmozomii de centură, desmozomii în spot* și *hemidesmozomii.* Prin intermediul desmozomilor, se realizează ancorarea împreună a celulelor, făcându-le capabile să funcționeze ca o unitate structurală. Hemidesmozomii leagă suprafața bazală a celulelor cu membrana bazală.

Epiteliile servesc ca barieră foarte selectivă a permeabilității, separând fluidele din compartimentele diferite ale corpului, menținând diferențe importante de compoziție chimică între acestea.

Joncțiunile strânse mențin funcția de barieră selectivă a epiteliilor. De exemplu, celulele epiteliului intestinal trebuie să mențină conținutul intestinal în lumenul intestinului și, în același timp, celulele trebuie să pompeze selectiv substanțele nutritive, prin traversul epiteliului către fluidul extracelular din partea opusă, de unde acestea sunt absorbite în sânge (4).

Joncțiunile comunicante sau *de comunicare* sunt cele mai obișnuite tipuri de joncțiuni celulare. Ele permit moleculelor mici, solubile în apă, să treacă direct din citoplasma unei celule în citoplasma celulei învecinate.

Organitele din citoplasma celulelor epiteliale prezintă variații cantitative și topografice, în comparație cu diferitele celule epiteliale sau din alte țesuturi, dar nu sunt deosebiri calitative.

Matricea celulară prezintă particularități calitative specifice țesuturilor epiteliale, datorită prezenței unor molecule organice specifice. Dintre acestea, numărul proteinelor prezente variază mult de la o specie de celule la alta. În schimb, majoritatea masei proteinelor, în toate speciile de celule, este reprezentată de șase tipuri de proteine: *actină, α– și β–tubuline, proteinele filamentelor intermediare, clatrina* (proteina veziculelor acoperite), *spasmina* (proteină care se contractă în prezența Ca^{2+}) și *calmodulina* (proteină cu afinitate pentru calciu) (4).

Filamentele intermediare ca *vimentina, desmina* și *gliofilamentele* sunt alcătuite dintr-un singur tip de unități proteice. Filamentele intermediare din citoscheletul extras din țesuturile epiteliale reacționează specific cu anticorpii anti–α–keratină epidermică și au fost denumite *citokeratine.*

Citokeratinele sunt alcătuite din proteine asemănătoare cu α–keratinele epidermice, formează o familie complexă cu asemănări biochimice și imunologice, se prezintă în diferite celule epiteliale în variate combinații, cu greutăți moleculare de 40 000 – 68 000 daltoni și $pH_i = 5 - 8$.

Citokeratinele din epiteliile umane se pot caracteriza astfel (4):

– În cursul diferențierii, în diferitele celule epiteliale, se formează citokeratine specifice fiecărui epiteliu.

Scanned with OKEN Scanner

– Au fost identificate 19 tipuri diferite de polipeptide keratinice în diversele tipuri de celule epiteliale de acoperire sau glandulare.

– Celulele epiteliale pot fi clasificate după tipul de keratină pe care-l conţin. Epidermul, ca şi celelalte ţesuturi epiteliale stratificate de tip pavimentos conţin mai multe tipuri de citokeratine acide sau bazice. Epidermul, împreună cu foliculul pilos, glandele sebacee şi sudoripare conţin 10 tipuri diferite de citokeratine.

– Examenul prin microscopia electronică arată că în citoplasma celulelor epiteliale sunt două forme de organizare a microfilamentelor intermediare, *fascicule* şi *reţea laxă*.

Fasciculele de microfilamente intermediare sunt prezente frecvent la periferia celulelor epiteliale, formând aşa-numitele *tonofilamente.*

Filamentele intermediare prezente în celulele epiteliale sub formă de reţea laxă sunt constituite din vimentină.

Ţesuturile epiteliale sunt aşezate, prin intermediul membranei bazale, pe un strat de ţesut conjunctiv numit *lamina propria,* care constituie o cale de legătură cu ţesuturile învecinate.

În mod obişnuit, vasele sanguine nu pătrund în epitelii, iar hrănirea epiteliilor depinde de difuzia substanţelor trofice, prin *lamina propria* şi membrana bazală.

Epidermul, ca şi celelalte ţesuturi epiteliale stratificate au unele procese biologice fundamentale comune: *mecanismul biogenezei* şi *al proliferării* şi *mecanismul diferenţierii.*

Epidermul este un epiteliu stratificat scuamos, la care pierderile prin descuamare au loc la suprafaţă, iar procesele de proliferare se produc la nivelul stratului bazal. Între aceste două straturi, celulele nu se mai divid şi trec printr-un proces de diferenţiere, care pentru keratinocitele umane, este de 2 – 4 săptămâni.

Stratul bazal al epidermului conţine circa 15 000 celule / mm^2. Aproximativ 10 % dintre aceste celule sunt celule pigmentare, celule Langerhans şi celule Merkel; restul celulelor (circa 90 %) sunt keratinocite de formă cilindrică sau prismatică, cu citiplasma bazofilă. O mică parte din keratinocitele stratului bazal (0,6 – 0,7 %) sunt celule stem, capabile să-şi păstreze numărul prin proliferare pe parcursul întregii vieţi a organismului, în ciuda pierderilor fiziologice sau patologice. Cea mai mare parte a celulelor stratului bazal proliferează, au capacitatea de a se diferenţia, adică de a evolua pe linia keratinocitară (4). Prin diviziunea celulelor stem, una din fiice păstrează caracterul matern, iar cea de a doua trece în compartimentul proliferativ, urmând procesul de diferenţiere. Keratinocitele angajate în diferenţierea kera-

Scanned with OKEN Scanner

tinocitară, atâta timp cât rămân în stratul bazal, îşi păstrează capacitatea de înmulţire şi reprezintă sursa principală de înlocuire a keratinocitelor uzate. După câteva diviziuni în stratul bazal, celulele precursoare trec în compartimentul funcţional care începe cu stratul spinos. În compartimentul funcţional (spinos, granulos, lucios şi cornos), celulele nu se mai divid şi are loc procesul de diferenţiere care se desăvârşeşte în stratul cornos (fig. 2.20).

Keratinizarea constă din sinteza şi depozitarea intracelulară a keratinei, care se constituie pe măsură ce celulele se deplasează din stratul bazal spre straturile superioare, atingând forma sa completă în stratul cornos unde umple celulele respective.

Keratina este o proteină fibroasă, insolubilă, anionică, foarte rezistentă la digestia enzimatică, are numeroase legături disulfidice şi dă o difracţie în razele X de tip α, ca şi miozina şi fibrinogenul.

Keratina provine din transformările chimice treptate ale citokeratinelor (filamentele intermediare ale scheletului celulelor din straturile precedente) şi din *keratohialina* stratului granulos. În cursul diferenţierii citokeratinelor, *prokeratina* se acumulează treptat în citoplasmă, începând cu stratul spinos, apoi se grupează sub formă de fascicule la periferia celulelor. Pe măsură ce celulele trec în straturile superioare, prokeratina se sulfatează, iar în stratul granulos superficial, se impregnează cu keratohialina. Keratohialina începe să fie sintetizată de ribozomii celulelor superioare ale stratului spinos şi atinge dezvoltarea maximă în stratul granulos. Constituirea α–keratinei, ca urmare a impregnării fasciculelor de prokeratină cu keratohialină, se face brusc la trecerea din stratul granulos în cel cornos, când are loc şi o complexare a sa cu *filagrina*, o proteină cationică prezentă numai în celulele stratului cornos. Apoi filagrina este degradată treptat, pe cale enzimatică, la aminoacizi (4).

2.3.2. ŢESUTURILE CONJUNCTIVE

Ţesuturile conjunctive au rolul de a uni diferitele organe sau diversele elemente ale aceluiaşi organ şi, de aceea, ele intră în constituţia tuturor organelor corpului animal. Acestea au un important rol mecanic, de rezistenţă la tracţiune şi de susţinere a diferitelor parenchimuri în relaţii spaţiale adecvate, participă intens la menţinerea homeostaziei prin procese continue de sinteză, degradare şi remodelare. Cu funcţiile ţesuturilor conjunctive, se corelează circulaţia lichidelor în ţesuturi, concentraţia extracelulară a electroliţilor, existenţa de bariere permeabile în mod selectiv, capacitatea peretelui arterial de a funcţiona ca un polimer cu două faze, ca şi mecanismul difuziunii alve-

Scanned with OKEN Scanner

olare, a filtrării glomerulare, a lubrifierii suprafețelor articulare, a apariției ovulației etc.

Țesuturile conjunctive sunt de *origine mezenchimală* (derivă din foița embrionară mijlocie, mezodermul). Țesuturile conjunctive sunt alcătuite din celule conjunctive și matrice intercelulară.

Țesuturile conjunctive, din punct de vedere morfologic, se caracterizează prin varietatea elementelor constitutive*: celule, fibre, substanță fundamentală, spații lacunare, vase sanguine, nervi etc.*

În țesuturile conjunctive, sunt prezente o mare varietate de celule, care se pot grupa în două categorii: a. *celule conjunctive propriu-zise, fibroblastele, mastocitele, celulele adipoase, celulele endoteliale din vasele sanguine* și b. *celulele de origine sanguină migrate în țesutul conjunctiv ca: macrofagele, plasmocitele, leucocitele.*

Matricea intercelulară constă din *fibre conjunctive* și *substanță fundamentală*. Fibrele conjunctive sunt: *colagenul, reticulina, elastina* și *fibrele oxitalanice*. Substanța fundamentală este formată din *glicozaminoglicani, proteoglicani, proteine* și *lichid tisular.*

Fibroblastele sunt celulele conjunctive cele mai răspândite în țesuturile conjunctive și au funcția principală de a sintetiza și secreta proteinele fibroase ale matricii extracelulare (colagenul și elastina), precum și glicozaminoglicanii, proteoglicanii, glicoproteinele care intră în alcătuirea substanței fundamentale. Fibroblastele iau naștere din celule mezenchimale sau din alte fibroblaste prin diviziune. Sunt celule fixe, în general, stelate, mai rar, turtite, fusiforme sau ovoide.

Colagenul, cea mai abundentă proteină a țesuturilor conjunctive, se sintetizează sub formă de procolagen la nivelul reticulului endoplasmatic rugos, de unde trece în aparatul Golgi, ajunge în veziculele secretorii și este eliberat din celulă, prin exocitoză, în matricea extracelulară, unde trece în tropocolagen și apoi în forma fibrilară. *Elastina* este sintetizată de către fibroblaste ca proelastină la nivelul reticulului endoplasmatic rugos și urmează aceeași cale, ca și procolagenul, până la formarea fibrei de elastină.

Fibrele oxitalanice sunt considerate o varietate de fibre elastice, mai groase și mai rezistente decât fibrele elastice, sunt rezistente la elastază și foarte rezistente la acizi. Ele se găsesc în număr mare în ligamentele dentare, împreună cu fibre colagenice și de reticulină.

Rata de secreție a diferitelor substanțe de către fibroblaste variază cu vârsta. La organismele tinere, fibroblastele sunt foarte active, iar procesul de reînnoire a componentelor extracelulare ale țesutului conjunctiv este intens. La bătrâni, acest proces este mult diminuat, mai ales procesul de secreție a componentelor substanței fundamentale.

Scanned with OKEN Scanner

Mastocitele sunt prezente în toate țesuturile conjunctive, mai abundente în derm şi căile respiratorii şi cu variații cantitative de la organ la organ.

Mastocitele au formă rotundă, ovală, mai rar, formă neregulată şi se găsesc de-a lungul vaselor sanguine. Ele participă la sinteza mucopolizaharidelor; secretă *heparina,* un anticoagulant sanguin; secretă *histamina,* o amină biogenă cu puternică activitate fiziologică, care stimulează mușchii netezi şi unele glande, au efect dilatant asupra capilarelor; secretă *serotonina,* un agent vasoconstrictor din serul sanguin, reglează activitatea nervoasă superioară etc.

Macrofagele sunt celule conjunctive care se găsesc în toate țesuturile conjunctive, sunt tot aşa de numeroase ca şi fibroblastele, iar în țesuturile puternic vascularizate, sunt chiar mai numeroase.

Proprietățile fundamentale ale macrofagelor sunt: mobilitatea, capacitatea de fagocitoză şi de secreție. Macrofagele sunt extrem de mobile în țesuturi şi această mobilitate poate creşte sub acțiunea unor factori chemotactici, aşa cum sunt toxinele bacteriene, proteinele denaturate etc. Fagocitoza este declanşată de impactul suprafeței celulare cu un antigen. Prin fagocitoză, sunt îndepărtate din țesuturi o serie de particule ca: microorganisme, complexe imune multimoleculare, resturi organice etc. Macrofagele pot secreta în mediul extracelular diferite substanțe ca: fracțiuni proteice, proteine pirogene care determină apariția febrei, interferoni, enzime ca elastaza sau colagenaza etc.

Plasmocitele, celule conjunctive, se găsesc în număr mic în țesuturile conjunctive. Sunt mai răspândite în țesuturile conjunctive din mucoasele organelor cavitare şi se găsesc în număr mare în unele inflamații cronice. Rolul plasmocitelor este de a sintetiza şi secreta toate tipurile de imunoglobuline din organism.

Leucocitele de diferite tipuri migrează în matricea conjunctivă intercelulară, traversând pereții capilarelor şi ai venulelor.

Celulele endoteliale, aşezate pe un singur rând, delimitează lumenul vaselor sanguine şi limfatice. Celulele endoteliale realizează procesul de schimb bidirecțional de substanțe între două compartimente fluide reprezentate de plasmă şi lichidul interstițial. Celulele endoteliale sintetizează steroli, din care o parte sunt distribuiți propriei plasmaleme. În citoplasma celulelor endoteliale, se găsesc numeroase microfilamente de actină şi miozină care produc modificări continue de contracție a celulelor endoteliale destinate reglării lumenului vaselor şi asigurării unei dinamici circulatorii normale. Celulele endoteliale au activitate secretorie, ca urmare a biosintezei glicoproteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

Adipocitele sau *lipocitele* sau *celulele grase* se întâlnesc mai rar ca celule izolate. De obicei, se asociază formând *țesutul adipos,* care este alcătuit din aglomerări de celule grase înconjurate de o bogată rețea vasculară și nervoasă. Funcția principală a adipocitelor este depozitarea trigliceridelor, când organismul dispune de un excedent de materiale energetice, pentru ca în momentele de privațiuni calorice, prin dislocarea acestor componenți, să se ofere organismului acizi grași ca substanțe energofage.

Celulele pigmentare au formă stelară, citoplasma lor fiind încărcată cu granule de pigment. Se întâlnesc în stratul bazal al epidermului, în derm, în coroida globului ocular. Aceste celule pot să-și sintetizeze singure pigmentul (*melanina*) sau să și-l înglobeze prin procesul de fagocitoză.

Matricea conjunctivă sau *substanța intercelulară* a țesutului conjunctiv este alcătuită din două componente principale: fibrele conjunctive (colagen, reticulină, elastină, fibre oxitalanice) și substanța fundamentală care apare amorfă, incoloră, transparentă, omogenă, vâscoasă și este alcătuită din diferite molecule (proteine fibroase, glicoproteine, glicozaminoglicani).

Colagenul este cea mai importantă și cea mai abundentă proteină din organismul uman (tabelul 2.2.) (4). El reprezintă aproximativ 25% din totalul proteinelor din organism.

Tabelul 2.2.

Conținutul de colagen și elastină în unele organe
(% substanță uscată în g)

Țesutul	Colagen	Elastină
Piele	71,9	0,6
Cartilaj	46,1 – 63,7	–
Tendonul lui Achile	86	4,4
Oase (în totalitate)	22,8	0,2
Oase (demineralizate)	88	0,2
Aortă	12 – 34	28 – 32
Cornee	68,1	–
Ficat	3,9	0,16 – 0,30
Plămâni	10,0	3 – 7

Scanned with OKEN Scanner

Cea mai importantă funcție a colagenului în organism este de a conferi rezistență și a păstra integritatea structurală a țesuturilor în constituția cărora intră. Fibrele de colagen sunt foarte rezistente la tracțiune. De exemplu, o fibră izolată de colagen, cu diametru de 1 mm se rupe la 10 – 40 kgf.

În organismele animale, colagenul se găsește sub diferite forme cunoscute ca tipuri. Sunt 28 de tipuri de colagen prezentate în literatură, despre care se tratează împreună cu întreaga problematică a colagenului în capitolul XI. De asemenea, elastina și reticulina se tratează în capitolele XI, XII.

Fibrele oxitalanice se găsesc în zone de maximă rezistență: în ligamentul alveolo-dentar, în zonula lui Zinn, în dermul pielii. Ele sunt înrudite cu elastina și sunt formate din numeroase fibrile de fibrilină, o glicoproteină care este esențială la formarea elastinei.

Substanța fundamentală ocupă spațiile dintre celulele și fibrele conjunctive. Este o componentă amorfă, transparentă, uneori gelatinoasă și elastică, alteori dură și elastică (în cartilaje) sau dură și rigidă (în oase).

Substanța fundamentală este formată din: *lichid tisular* (70%), *mucopolizaharide acide* (5 – 20 %), *proteine* (20 – 25%). Lichidul tisular se aseamănă cu plasma sanguină din care derivă, dar se deosebește prin conținutul mai scăzut în proteine, prin instabilitatea cantității de apă, săruri și glucoză, prin acumularea acestor produși și eliberarea lor în anumite stări fiziologice. Substanța fundamentală reprezintă un important rezervor de apă și proteine din organism. *Mucopolizaharidele* conferă țesutului conjunctiv maleabilitate, elasticitate, vâscozitate, au rolul de a controla deplasările apei și a electroliților extracelulari. Principalii componenți ai mucopolizaharidelor sunt: *acidul hialuronic*, foarte abundent în umoarea sticloasă, lichidul sinovial, tendoane, piele, cordonul ombilical; *acizii condroitin sulfați,* localizați în piele și tendoane; *sulfatul de dermatan* din valvulele cardiace, tendoane și piele; *acidul heparin-sulfuric* prezent în cantitate mare în cornee; *sulfatul de keratan* din cornee și cartilajul costal. *Proteinele* din substanța fundamentală, unele solubile în soluții acide, altele în soluții alcaline, s-au dovedit a fi de natură colagenică (6). În afară de aceste proteine, în substanța fundamentală, se mai găsesc proteine serice, dar și ioni identici cu ai serului sanguin.

Țesuturile conjunctive se pot împărți după predominanța uneia dintre cele trei componente ale sale (celule, fibre, matrice extracelulară), după modul de orientare a fibrelor supuse la presiune și după natura funcțiilor pe care le îndeplinesc în: a. *țesuturi conjunctive propriu-zise: lax sau areolar și dens orientat sau neorientat* și b. *țesuturi conjunctive cu proprietăți speciale: elastic, reticular, mucos, adipos.*

Scanned with OKEN Scanner

a. Ţesuturile conjunctive propriu-zise. Ţesutul conjunctiv lax sau areolar este ţesutul conjunctiv cel mai răspândit din organism. Se găseşte în hipoderm, în muşchi, între diverse organe, sub pleură, peritoneu, formând *ţesutul interstiţial.* Ţesutul conjunctiv lax propriu-zis îndeplineşte o serie de funcţii: de susţinere, de legătură, de amortizare, reglarea circulaţiei generale, de protecţie etc. Celulele sale (fibrocitele, histocitele, mastocitele, plasmocitele) şi celulele ce aparţin altor ţesuturi sunt distribuite printre fibre şi în masa substanţei fundamentale. Sistemul fibrilar este format din reticulină, colagen şi puţină elastină. Substanţa fundamentală este abundentă şi conţine multe mucopolizaharide.

Ţesutul conjunctiv dens este format din toate tipurile de celule conjunctive, dar mai ales din fibroblaste. Sunt prezente fibrele de colagen care predomină şi care se dispun, pe alocuri, în formă de mănunchiuri cu orientări determinate de forţele mecanice ce acţionează asupra lor. Între mănunchiurile de fibre colagenice se pot găsi şi rare fibre elastice şi de reticulină. După cum fasciculele de fibre colagenice, sunt sau nu orientate, ţesutul conjunctiv dens se împarte în *ţesut dens neorientat (neordonat)* şi *ţesut dens orientat (ordonat).* Ţesutul conjunctiv dens neorientat se găseşte în stratul reticular al dermului pielii, în corionul unor mucoase (exemplu, unele zone ale mucoasei bucale, în submucoasa tractului digestiv etc.).

Ţesutul conjunctiv dens orientat se găseşte în *tendon, ţesutul conjunctiv lamelar* şi *aponevroze.*

Tendonul este un organ conjunctiv format din fibre colagenice aşezate paralel între ele. Matricea celulară este într-o cantitate foarte mică. Mai multe fascicule de fibre colagenice, împreună cu tenocitele (celule conjunctive ce derivă din fibroblaste) şi matricea extracelulară formează tendonul primar care este înconjurat de o tunică de ţesut conjunctiv lax. Mai multe tendoane primare se unesc şi formează un tendon secundar înconjurat, de asemenea, de o tunică conjunctivo-vasculară. Tendoanele secundare constituie tendonul ca organ, fiind înconjurat cu o teacă conjunctivo-vasculară. Tendonul este lipsit de vase, hrănindu-se prin difuziune. Tendonul face legătura dintre muşchi şi os.

Aponevrozele acoperă muşchiul sau grupul de muşchi şi sunt formate, la om, din 2 – 3 foiţe conjunctive suprapuse. Foiţele sau lamele sunt formate din fibre de colagen paralele între ele, fibroblaste turtite şi puţină matrice extracelulară. Fibrele colagenice dintr-o foiţă sunt aşezate perpendicular faţă de foiţa de fibrele colagenice din foiţa următoare.

Ţesutul conjunctiv lamelar este format din lamele subţiri şi aşezate concentric, ca foile dintr-o ceapă (4). Fibrele de colagen sunt dispuse paralel unele faţă de altele sau neorientat în matricea extracelulară. Între ele sunt şi

Scanned with OKEN Scanner

puține fibre elastice și de reticulină. Țesutul conjunctiv lamelar se găsește în cornee, în teaca conjunctivă de înveliș a firelor de păr, în teaca nervului, în unii corpusculi senzitivi.

b. Țesuturi conjunctive cu proprietăți speciale. Țesutul elastic este format, în primul rând, din fibre elastice, orientate pe una sau două direcții, conține puține celule și au o cantitate mică de substanță fundamentală. Ligamentul cervical, tunica abdominală și altele intră în categoria țesuturilor conjunctive elastice.

Țesutul conjunctiv reticular este format din celule reticulare, fibre de reticulină și substanță fundamentală. El formează rețeaua de susținere a ficatului, a măduvei osoase, a organelor limfoide și se găsește, de asemenea, în structura mucoaselor respiratorii și digestive.

Țesutul conjunctiv adipos constituie, pentru organism, un rezervor de substanțe energetice, care se reînnoiește continuu. Țesutul adipos are rol metabolic, de protecție împotriva variațiilor de temperatură, rol de amortizor pentru unele organe supuse la diferite presiuni etc. El este constituit din celule conjunctive care au acumulat grăsimi și, adesea, se grupează formând *lobuli adipoși,* puțină substanță fundamentală și fibre conjunctive.

Țesutul conjunctiv pigmentar are celulele denumite *cromatocite,* încărcate cu pigment; la mamifere, cel mai important pigment este *melanina*; se găsește în epiderm, derm, coroidă, iris etc.

Țesutul conjunctiv mucos conține o cantitate mare de matrice extracelulară, puține fibroblaste, fibre rare și foarte lungi. La om, țesutul mucos se întâlnește în cordonul ombilical și în pulpa dinților foarte tineri.

Țesuturile de susținere (de suport) sunt *țesuturile cartilaginoase* și *țesuturile osoase.*

Țesuturile cartilaginoase au substanța fundamentală consistentă și elastică. În compoziția substanței fundamentale, intră un condromucoid bogat în sulf, acid condroitin-sulfuric și un albuminoid, formând compusul numit *condrină.* În substanța fundamentală, se găsesc celule și fibre. Celulele din țesutul cartilaginos sunt celule mezenchimale modificate (*condroblaștii*) care, atunci când ajung la maturitate, se numesc *condrocite,* se găsesc așezate într-o lacună de substanță fundamentală, numită *condroplast.* Sistemul fibrilar este dezvoltat, dar în unele cartilaje, așa cum este cazul *cartilajului hialin,* este mascat de substanța fundamentală. Când predomină fibrele colagenice, care sunt grupate în fâșii, cartilajul se numește fibros. În alte cazuri, fibrele elastice sunt dominante; așa este cazul cartilajelor elastice.

Țesutul osos este foarte consistent, rezistent, are rol de suport și de protecție pentru organism. În componența sa, intră substanța fundamentală

Scanned with OKEN Scanner

numită *oseină*, în care se găsesc elemente fibrilare şi celule osoase denumite *osteocite*.

Substanța fundamentală conține săruri fosfocalcice şi este organizată în sisteme lamelare. Structura fibrilară este colagenică. Sărurile minerale, reprezentate, în special, prin fosfații de calciu, care se găsesc sub formă de hidroxiapatite, cristale hexagonale orientate în lungul fibrelor de colagen, sunt în proporție de 65 – 70 %. Celulele osoase sunt *osteoblastele* (celulă osoasă mezenchimală), *osteocitul* (celulă matură aşezată în *osteoplast*) şi *osteoclastul* (celulă diferențiată a celulei osoase, cu rol activ în osteogeneză).

În organism, se disting două varietăți de țesut osos: *țesutul osos compact* şi *țesutul osos spongios*. *Țesutul osos compact* este varietatea de țesut în care substanța fundamentală este structurată sub formă de lamele osoase concentrice, centrate în jurul unor canalicule orientate în sensul lungimii osului şi ocupate de vase sanguine, limfatice, terminațiuni nervoase. Țesutul osos compact intră în alcătuirea porțiunii de mijloc a oaselor lungi. *Țesutul osos spongios* este format din lamele osoase incomplete, scurte şi neregulate, încrucişate între ele, care delimitează spații de forme şi mărimi variabile, ocupate de măduva osoasă. Țesutul spongios se găseşte la capetele oaselor lungi şi în porțiunea centrală a oaselor late şi scurte.

În substanța fundamentală a țesutului osos, se găsesc fibre colagene pe care nu se depun săruri de calciu şi care sunt mai abundente la periferia osului. Aceste fibre contribuie la elasticitatea şi rezistența osului.

2.3.3. ȚESUTUL MUSCULAR

Țesutul muscular provine din *mezoderm*, celulele mezenchimale diferențiindu-se în celule musculare tinere, denumite *mioblaste* care se divid activ şi formează întregul țesut muscular. Celulele musculare adulte sunt *miocitele*. După particularitățile structurale ale fibrelor musculare, se deosebesc trei tipuri de țesuturi musculare: *țesut muscular neted, țesut muscular striat* şi *țesut muscular cardiac*.

Țesutul muscular neted este format din fibre musculare fusiforme, cu extremitățile alungite şi partea centrală îngroşată. Formează musculatura viscerală a tractusului gastrointestinal, a traheii, a arterelor, a peretelui uterin etc.

Țesutul muscular striat este format din fibre musculare, sub forma unor cordoane cilindrice sau poligonale lungi de 3 – 12 cm şi cu diametrul de 20 – 100 microni. Țesutul muscular striat formează masa principală a musculaturii scheletice şi reprezintă circa 40 % din greutatea corpului.

Scanned with OKEN Scanner

Ţesutul muscular cardiac este un ţesut de origine mezoblastică şi constituie peretele contractil al cordului. Este un ţesut muscular care prezintă caracteristici ce aparţin ţesutului muscular neted, cât şi ţesutului muscular striat.

2.3.4. ŢESUTUL NERVOS

Ţesutul nervos îşi are originea în ectoderm şi este constituit din *celule nervoase* şi *celule nevroglice*. Celulele nervoase, denumite *neuroni*, sunt elementele cu cel mai înalt grad de specializare. Celulele nevroglice au rol de legătură, susţinere şi secreţie.

2.3.5. ŢESUTUL SANGUIN ŞI LIMFATIC

Ţesutul sanguin şi limfatic. Sângele şi limfa au origine mezenchimală, ca şi ţesutul conjunctiv.

Sângele circulă în organism într-un sistem de vase închise, de la cord spre periferie şi invers, iar limfa circulă într-un singur sens, de la periferie înspre cord. Limfa circulă şi în afara vaselor închise, umplând spaţiile intercelulare. Sângele este format din *plasmă* şi un mare număr de celule (*eritrocite, leucocite* şi *trombocite*) aflate în suspensie. Plasma reprezintă 55 % din masa totală a sângelui şi este alcătuită din 90 % apă, 9 % substanţe organice (proteine, enzime, hormoni, acizi graşi, colesterol, vitamine, produse rezultate în urma metabolismului celular) şi 1 % substanţe anorganice (clorură de sodiu, fosfaţi de calciu şi magneziu, carbonaţi şi bicarbonaţi de sodiu etc.).

Limfa este un lichid coloidal, biologic, rezultat din transsudarea plasmei sanguine la nivelul spaţiilor interstiţiale. Reprezintă partea din lichidul interstiţial care ajunge în curentul sanguin prin intermediul circulaţiei limfatice. Faţă de plasma sanguină, limfa este mai săracă în proteine şi conţine cantităţi mai mari de grăsimi şi cloruri.

Bibliografie selectivă:

1. Lehninger, A.L., *Biochimie*, vol. I şi II, Editura Tehnică; Bucureşti, 1987

2. Diculescu, I, Onicescu D., Benga G., Popescu L.M., *Biologie celulară*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1983

Scanned with OKEN Scanner

Pillinger, M.H., Snyidman, D.R., Editors, *Jear Book of Medicine*, Elsevier Inc., 2005

22. Petsko, G., *Protein Structure and Functions*, Brandeis University, Blackwell Publishing , USA., 2003

23. Darralyn, Mc Call, Stock, D., Achey, Ph, *Introduction to Microbiology*, Blackwell Publishing USA., 2001

24. *Basic Molecular Biology*, 3rd Edn, Latchman D.S., Blackwell Publishing, USA., 1997

25. *Essential Development Biology*, 2nd Edition, Slack, J.M.W., Blackwell Publishing, USA., 2005

26. *Biologie moléculaire de la cellule*, Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J., Boeck University, Amazon com., Bornes & Noble com., USA., 2000

27. Cooper, G.M., *La Cellule*, Boeck University, Amazon com., Bornes & Noble com., USA., 1999

28. Karp, G., *Biologie cellulaire et moléculaire*, Boeck University, Amazon com., Bornes & Noble com., USA, 2004

29. Bruce, Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, ed. 4, publ. Garland Science., 2002

30. Thompson, D.W., *On growth and form*, 2nd Ed., reprinted Cambridge, Cambridge University Press, 1968

31.Brown, C.H., *Structural materials in animals*, London, Pitmaqn, 1975

32. Vincent, J.F.V., *Structural biomaterials*, revised ed., New Jersey, Princepton University Press, 1991

33. Byrom, D., *Biomaterials*, novel materials from biological sources, New York, Macmillan, 1991

34. Elices, M., editor, *Structural biological materials*, Pergamon Press New York, 2001

35. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lernous, J.E., *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*, Academic Press, New York, 2005

36. Kamat, S., Su, X., Ballarini, R., Hener, A.H., *Structural basis for fracture toughness of the shell of conch Strombas gigas*, Nature, 405, pp. 401 – 416, 2000

37. Whitesides, G.M., *Organic material science*, Mater. Res. Soc. Bull., 42, pp. 395 – 403, 2002

38. Meyers, M.A., Lin, A.Y.M., Scki, Y., Chen, P.Y., Kad, B.K., Bodde, S., *Structural biological composites*, An overview, JOM, 58, pp. 35 – 41, 2006

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

APA

3.1. Considerații generale 120
3.2. Proprietățile fizice ale apei 123
3.3. Structura apei și a gheții 125
3.4. Apa grea 131
3.5. Soluțiile în apă 132
3.5.1. Aciditatea și alcalinitatea soluțiilor 134
3.6. Apa ca solvent 139

Bibliografie *142*

3.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Apa este la originea vieții pe pământ și este indispensabilă supraviețuirii a tot ce este viu.

Apa acoperă trei sferturi din suprafața planetei și se găsește sub formă lichidă în ploaie, cursuri de apă, lacuri, pânze de apă subterană, mări, oceane, în sol, animale și vegetale și sub formă de vapori, zăpadă și gheață.

Apa a apărut pe pământ cu circa patru miliarde de ani în urmă și este evaluată la circa 1 400 milioane de km^3. Același volum de apă se transformă neîncetat în vapori, apoi în apă lichidă și gheață, ciclu care se perpetuează continuu. În natură, prin acțiunea conjugată a căldurii solare și a presiunii atmosferice, apa de la suprafața apei lichide, din solurile umede, din frunzele plantelor își schimbă starea, ea se evaporă, trecând în atmosferă, sub formă de vapori invizibili, unde rămâne până la circa opt zile. Acești vapori formează norii, din care apa sub formă de ploaie, zăpadă sau grindină (520 km^3 de precipitații) cade pe continente, mări și oceane și alimentează rezervele

de apă dulce ale planetei. În raport cu masa totală a hidrosferei, vaporii de apă reprezintă doar 0,001 % din totalul apei de pe planetă.

Apa dulce de pe planetă reprezintă doar 2,8 % din apa totală de pe glob. Din acest procent, 2,15 % este apa din gheţarii polari, 0,63 % apa subterană şi 0,019 % este apa de suprafaţă (lacuri, fluvii, râuri). Restul de apă, 97,2 %, este apa sărată a mărilor şi oceanelor, din care 90 % este apa oceanelor, care acopere 71 % din suprafaţa planetei.

Pe plan mondial, problema aprovizionării cu apă dulce devine în fiecare zi tot mai preocupantă. Situaţia este precară mai ales în unele regiuni ale globului şi se accentuează pe măsura creşterii populaţiei.

Toate organismele animale şi vegetale conţin apă, care, după proporţia sa, este, pe de altă parte, componentul principal al materiei vii. Vegetalele conţin o cantitate mai mare de apă (pepenele conţine 95 % apă, morcovul 85 %, iarba 78 % etc.). În organismele animale, apa se găseşte, în medie, în proporţie de peste 60 %. Organismele unor animale marine conţin până la 96 – 97 % apă. Conţinutul mediu în apă a vertebratelor este mai redus din cauza scheletului care ocupă un procent important din organism şi este mai sărac în apă.

Organismul omului adult conţine 58 – 66 % apă, în funcţie de adipozitate. Conţinutul în apă este influenţat şi de vârstă. Astfel, embrionul de câteva zile are 97 % apă, fătul de trei luni 94 %, nou–născutul 66 %. Conţinutul în apă a unor organe, ţesuturi şi lichide din organismul uman este foarte variat. Astfel, lichidele din organismul omului [saliva (99,5 %), sudoarea (99,5 %), lichidul cefalorahidian (90 %), sucul gastric (97 %), limfa (96 %), laptele (89 %), sângele (78 – 83 %)] au 78 – 99,5 % apă. Ţesuturile conţin 70 – 83 % apă, scheletul osos 20 – 30 % apă. Muşchii au 73 – 76 % apă, dar din cauza masei musculare mari a organismului uman, aceştia conţin jumătate din cantitatea de apă a organismului.

Cele aproximativ 60 % apă din organismul uman se repartizează între vasele sanguine şi limfatice, spaţiile intercelulare şi în celule, domenii cu compoziţii şi roluri funcţionale diferite. Lichidul intracelular reprezintă 50 % din greutatea corpului şi lichidul extracelular (plasma sanguină şi lichidul interstiţial) 20 % din greutatea corpului (fig. 3.1.) (8).

În organism, apa are rol structural, intrând în constituţia diverselor geluri, fiind reţinută prin capilaritate; de asemenea, se găseşte în spaţiile libere dintre moleculele mari sau reţinută fizic la suprafaţa moleculelor proteice.

Scanned with OKEN Scanner

Apa în organism îndeplineşte rolul de solvent al unui mare număr de compuşi organici şi anorganici. Pe această bază, are rolul de a transporta în organism substanţele nutritive şi mediatorii controlului umoral, cât şi produsele de excreţie rezultate în urma diverselor metabolisme (8).

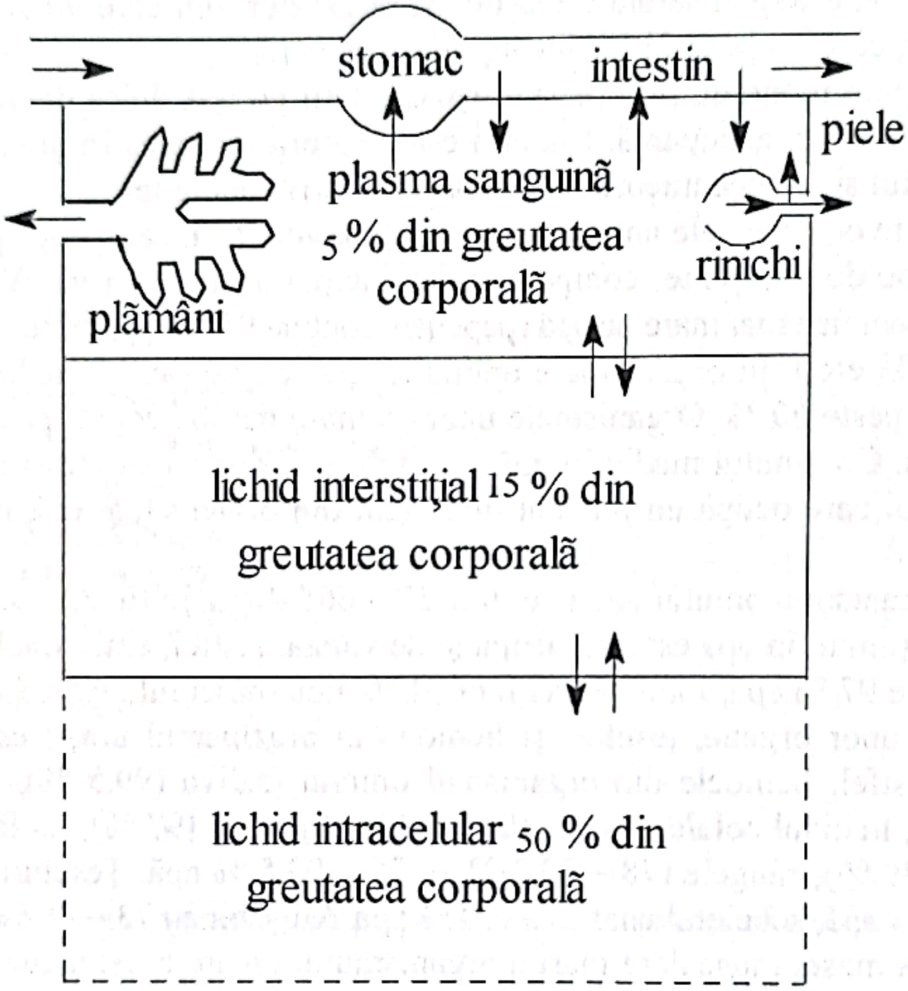


Fig. 3.1. Repartiţia apei în organism (după Gamble) (8)

Apa are rol în diverse reacţii biochimice fundamentale: a. participă la reacţii hidrolitice, ca de exemplu, la digestia alimentelor, la dislocarea majorităţii constituenţilor organismului, la hidroliza ATP-ului şi a altor compuşi macroergici, în urma cărora se eliberează energie; b. participă la reacţii de oxido-reducere, care, de cele mai multe ori, sunt reacţii de hidratare urmate de reacţii de dehidrogenare (8).

Apa este alimentul indispensabil care asigură, în organism, desfăşurarea normală a metabolismului tuturor celorlalte principii nutritive.

În anul 1781, Henry Cavendish a constatat că apa se formează la arderea hidrogenului în aer. Antoine Laurent Lavoisier, repetând experienţa lui

Scanned with OKEN Scanner

Cavendish, a realizat sinteza apei, arătând că 2 grame de hidrogen şi 16 grame de oxigen duc la formarea a 18 grame de apă.

În 1805, Alexander von Humboldt şi L.J. Gay–Lussac au arătat că apa este formată din două volume de hidrogen şi un volum de oxigen.

Proprietăţile fizice şi chimice ale apei, diferite de cele ale altor substanţe, au la origine legătura de hidrogen (6). Aceasta are o puternică înclinare de a dizolva alte substanţe. Apa conţinută în corpul uman serveşte ca suport unui număr mare de reacţii şi schimburi care sunt necesare vieţii.

Apa dizolvă dioxidul de carbon din aer, care se transformă în acid slab, capabil să dizolve calcarul. La creşterea temperaturii sau la o aerare a apei, calcarul se reprecipită sub formă de tartru (tartrat acid de potasiu). În acest fel, apa oceanelor reglează conţinutul de dioxid de carbon din atmosferă.

Apa lichidă nu se comprimă şi nici nu-şi creşte volumul (principiul lui Pascal).

3.2. PROPRIETĂŢILE FIZICE ALE APEI

Apa are punctul de topire, punctul de fierbere, căldura de topire, căldura de evaporare, căldura specifică, constanta dielectrică şi tensiunea superficială mai mari decât a unor hidruri comparabile, ca H_2S sau NH_3 sau decât ale celor mai multe lichide obişnuite. Toate aceste proprietăţi indică faptul că forţele de atracţie a moleculelor apei lichide, respectiv coeziunea sa internă, sunt relativ mari.

Se dau mai jos câteva dintre caracteristicile fizice ale apei:

– presiunea de vapori a apei la 20°C sau 293° K = 17,5 torr şi la 100°C sau 373 K = 760 torr sau 1,0 atm;

– căldura latentă de vaporizare a apei la punctul de fierbere, la presiunea de 1 atm este de 540 cal / g sau 9 729 cal / mol;

– punctul de topire = 273°K;

– căldura latentă de topire = 80 cal / g;

– căldura latentă molară de topire = 1 440 cal / mol;

– căldurile molare, la presiune constantă (C_p), a vaporilor de apă la presiunea de 1 atm sunt:

- 0°C 7,98 cal / grad. mol
- 1 000°C 10,58 cal / grad. mol
- 2 000°C 12,45 cal / grad. mol;

– tensiunea superficială a apei la 20°C = 72,7 dyne / cm;

- rezistivitatea sau rezistența specifică (ρ) în ohmi^{-1}. cm = 2,5 . 10^{7};
- conductibilitatea specifică (1 / ρ) în omi. cm^{-1} = 4 . 10^{-8} ;
- momentul electric al apei în formă gazoasă, în unități debye D = 1,84;
- constante critice ale apei:
  - temperatura critică, 647°K sau 374°C
  - presiunea critică, atm, 218,5
  - volumul molar critic, cm^3, 57

La înghețarea apei, are loc o scădere bruscă a densității, respectiv o creştere a volumului cu aproape 10 %. Densitatea gheții la 0°C este de 0,91g / cm^3. Punctul de solidificare a apei (0°C şi 760 torr) scade când se măreşte presiunea. Mărirea presiunii deplasează echilibrul gheață–apă lichidă înspre forma cu volumul mai mic şi densitatea mai mare, deci spre apă lichidă.

Anomaliile densității apei au o mare influență asupra climei planetei şi asupra vieții animalelor şi plantelor. Apa la 4°C are densitatea mai mare decât apa mai caldă sau mai rece şi, de aceea, se adună la fundul mărilor şi oceanelor. Aceasta are până la adâncimea de 1 000 m temperatura de 4°C, iar între 1 000 şi 3 000 m, circa 3°C. Din cauza acestui fenomen, apele mai adânci nu îngheață până la fund şi fac astfel viața posibilă.

Apa este un lichid transparent, aproape fără culoare, cu o uşoară nuanță de albastru.

Velocitatea sunetului în apă este de 1 500 m / s, în condiții normale de presiune şi temperatură.

Există o situație unică (T, P) în care apa coexistă sub trei forme: solidă, lichidă şi gazoasă, acesta este *punctul triplu al apei* şi are loc la o temperatură de 0,01°C (273,16 K) şi o presiune de 611,2 Pa [Pa (Pascal) este unitate S.I. de constrângere şi presiune, în care 1Pa=10^{-5} bar sau ≈9,98233.10^{-6}atm]. Unitățile de temperatură (grade Celsius sau Kelvin) sunt definite grație acestui punct triplu al apei.

Masa unui litru de apă la temperatura de 4°C este de 1 Kg.

Căldura masică a apei este de 4 186 J / Kg. K în condiții normale de temperatură şi presiune. Apa a fost utilizată ca etalon de căldură în vechile sisteme de unități, caloria fiind căldura necesară creşterii cu un grad Celsius a temperaturii unui gram de apă, adică 4 186 Jouli.

Apa are o forță de coeziune ridicată, care o face să se evaporeze cu dificultate. Aceasta conduce la faptul că faza lichidă să existe la temperatura de pe pământ, fază care este indispensabilă vieții.

Scanned with OKEN Scanner

Întrucât oxigenul apei are o electronegativitate mai mare decât a hidrogenului, partea moleculei de apă unde se găseşte atomul de oxigen este mai încărcată negativ, în comparaţie cu partea hidrogenului. O moleculă cu o astfel de diferenţă de încărcare se numeşte dipol. Apa are un moment dipol de 1,83 D. Această diferenţă de încărcare electrică face ca moleculele de apă să se atragă între ele. O astfel de legătură electrică dintre două molecule de apă se numeşte legătură de hidrogen. Polarizarea permite moleculelor de apă să dizolve substanţele ionice şi să le menţină în această stare, prin înconjurarea fiecărui ion, cu înveliş de molecule de apă; aceasta este solvatarea. Forţele de atracţie sunt sursa unor proprietăţi ca punctul de fierbere ridicat, deci cu o capacitate calorică ridicată.

Apa pură nu se găseşte în natură şi poate fi obţinută prin procese fizice. Singurii săi compuşi sunt moleculele de apă şi ionii produşi prin hidroliza moleculelor de apă:

$$H_2O = H^+ + OH^- \text{ sau}$$
$$2H_2O = H_3O^+ + OH^-$$

Apa la presiunea ambiantă (aproximativ un bar) şi temperatura de 0° – 100°C este lichidă, peste 100°C este gazoasă şi sub 0°C este solidă.

3.3. STRUCTURA APEI ŞI A GHEŢII

Anomaliile proprietăţilor fizice ale apei se datorează asocierii moleculelor de apă prin legături de hidrogen. Apa lichidă nu este formată din molecule independente, ci din molecule asociate. În stare de vapori, apa este compusă din molecule.

Forţele intermoleculare puternice din apa lichidă se datorează distribuţiei specifice a electronilor în molecula de apă. Fiecare dintre cei doi atomi de hidrogen pune în comun cu atomul de oxigen o pereche de electroni, prin suprapunerea orbitalilor 1s ai atomilor de hidrogen cu doi orbitali hibrizi sp^3 ai atomului de oxigen. Pe baza analizelor cu raze X, unghiul legăturii H–O–H este de 104,5°, iar media distanţei interatomice hidrogen–oxigen este de 0,0965 nm. Acest aranjament al electronilor din molecula de apă îi dă acesteia asimetria electrică. Atomul de oxigen puternic electronegativ tinde să atragă electronii unici ai atomilor de hidrogen, lăsând nucleul de hidrogen dezgolit. Ca urmare, fiecare dintre cei doi atomi de hidrogen are o încărcare locală parţial pozitivă. În schimb, atomul de oxigen are o încărcare locală

Scanned with OKEN Scanner

parțial negativă, localizată în zona orbitalilor nepuși în comun. De aceea, deși molecula de apă nu are o încărcare netă, ea este un dipol electric (1).

Când două molecule de apă se apropie puternic una de alta, se produce o atracție electrostatică între încărcarea parțial negativă a atomului de oxigen al moleculei de apă și încărcarea parțial pozitivă a unui atom de hidrogen al moleculei de apă adiacente. Aceasta este însoțită de o redistribuire a încărcărilor electronice în ambele molecule, ceea ce crește semnificativ atracția dintre ele. O astfel de asociere electrostatică complexă se numește *legătură de hidrogen* (1). Legătura de hidrogen este, deci, de natură electrostatică, dar de un tip special, depinzând de prezența unui atom de hidrogen covalent și a doi atomi foarte electronegativi.

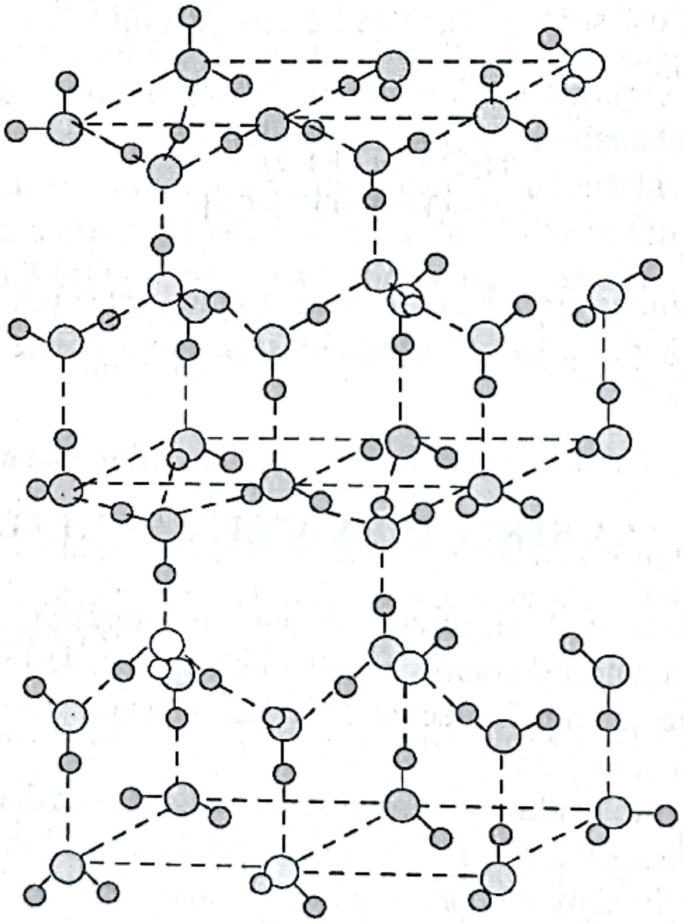


Fig. 3.2. O porțiune din cristalul de gheață
○ = atomii de oxigen . ○ = atomii de hidrogen

Apa este o substanță deosebit de capabilă de a forma legături de hidrogen. Fiecare moleculă de apă are doi atomi de hidrogen și două perechi de electroni neparticipanți și, în consecință, poate forma patru legături de hidrogen. Aranjamentul tetraedric al perechilor de electroni, participanți și neparticitanți, determină ca aceste patru legături să se extindă în patru direcții te-

Scanned with OKEN Scanner

traedrice în spațiu, ajungându-se la structura cristalină caracteristică gheței (fig. 3.2.) (4).

Gheața are un aranjament de bază, într-o rețea hexagonală, unde fiecare moleculă de apă are legături de hidrogen cu vecinele sale. În gheața foarte puternic răcită, o moleculă de apă leagă alte patru molecule de apă prin legături de hidrogen; gheața are o structură mai afânată şi o densitate mai mică decât a apei fluide. La 0°C, 15 % din legăturile de hidrogen se desfac, apa continuă să aibă o structură cristalină, dar din ce în ce mai mobilă. Cu creşterea temperaturii, agregarea moleculelor de apă începe să se desfacă şi se constată o creştere a densității lichidului, care atinge un maximum la 4°C. Peste această temperatură, din cauza agitației moleculare, valoarea densității descreşte din nou:

0°	4°	10°	15°	20°
d = 0,999 866	1,000 000	0,999 727	0,999 127	0,998 230 g / cm^3

Către 40°C, 50 % dintre legăturile de hidrogen se desfac şi apa devine mai fluidă şi mai reactivă. Apa lichidă conține numeroase legături de hidrogen şi la 100°C, fapt dovedit de valorile mari ale căldurii de evaporare şi a constantei dielectrice ale sale.

Legăturile de hidrogen au lungimi diferite în funcție de geometria structurală şi distribuția electronilor, în moleculele între care se fac legăturile. În gheață, lungimea legăturii de hidrogen este de 0,177 nm (fig.3.3.)

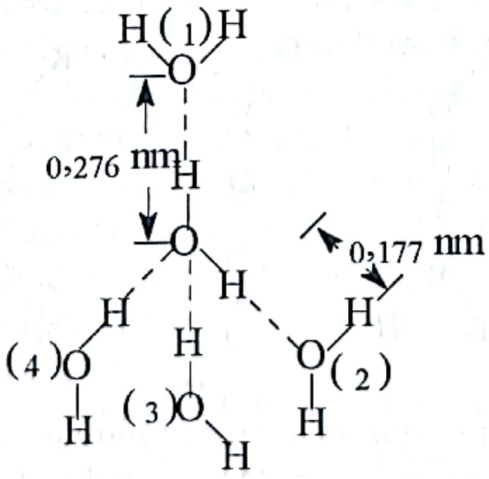


Fig. 3.3. Legături de hidrogen dispuse tetraedric în jurul unei molecule de apă, în gheață. Moleculele 1 şi 2 şi molecula din centru sunt dispuse în planul paginii. Molecula 3 este dispusă deasupra paginii şi molecula 4 în spatele paginii.

Scanned with OKEN Scanner

În forma cristalină de gheaţă, când fiecare moleculă de apă leagă, prin legături de hidrogen, patru molecule de apă vecine, se formează o reţea în care distanţa medie oxigen–oxigen este de 0,276 nm (fig. 3.3.). La 15°C, această distanţă medie este de 0,290 nm şi la 83°C de 0,305 nm (1).

Legăturile de hidrogen sunt relativ slabe. Legăturile de hidrogen din apa lichidă au o energie de legătură de 4,5 kcal / mol, faţă de 110 kcal / mol a legăturilor covalente H–O din molecula de apă.

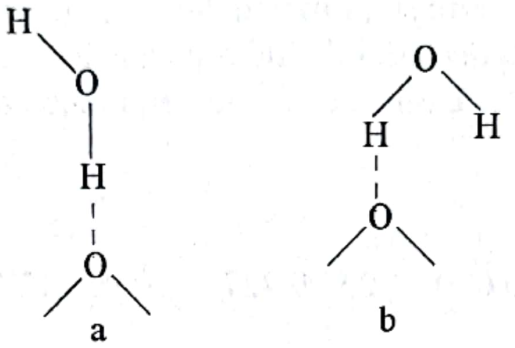


Fig. 3.4. Orientarea legăturii de hidrogen

Legăturile de hidrogen sunt mai puternice, atunci când cele două grupări care interacţionează sunt orientate în sensul realizării unei atracţii electrostatice maxime. De exemplu, când legătura H–O este liniară cu atomul acceptor, legătura de hidrogen formată va avea maximum de stabilitate (fig. 3.4.a). Când oxigenul acceptor nu este pe vectorul electric al legăturii O–H, se formează o legătură de hidrogen mai slabă (fig. 3.4.b).

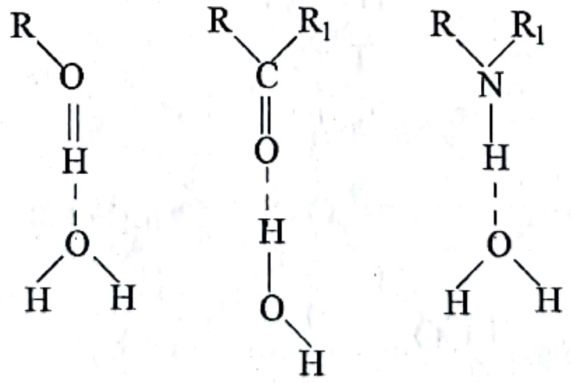


Fig. 3.5. Legături de hidrogen între moleculele de apă şi grupe reactive ale unor molecule organice

În fig. 3.5., se prezintă câteva legături de hidrogen între apă şi unele resturi de molecule organice cu importanţă biologică.

Legăturile de hidrogen nu se formează numai în apă. Ele au tendința de a se forma între un atom mic, puternic electronegativ (exemple, oxigen, azot, fluor, mai rar clor) şi un atom de hidrogen legat covalent la un alt atom electronegativ (1, 2). Legăturile de hidrogen se pot forma între două molecule sau între două părți ale aceleiaşi molecule.

Apa lichidă este formată dintr-un amestec de molecule libere, molecule legate două câte două, grupe de patru şi de opt molecule aşezate ca în gheață, cu un spațiu între ele. Proporția dintre cele patru forme diferă în funcție de temperatură.

Creşterea volumului apei prin înghețare, cu până la 10 %, cu formarea de cristale, poate provoca dezorganizarea structurilor materiei vii. Temperaturile foarte scăzute pot fi suportate, cu păstrarea organizării şi a vieții latente, după o prealabilă desicație.

Pentru ruperea legăturilor de hidrogen şi a producerii agitației termice corespunzătoare creşterii temperaturii cu un grad, apa are nevoie de mai multă căldură decât alte lichide. Căldura specifică sau capacitatea calorică mare a apei explică inerția termică a acesteia. Se încălzeşte şi se răceşte greu, adică are tendința de a-şi păstra temperatura, fapt deosebit de important pentru toate viețuitoarele, îndeosebi pentru cele acvatice.

O consecință a legăturilor dintre moleculele de apă este căldura de evaporare mare a acesteia, de 0,538 cal / g, față de 0,202 cal / g pentru alcool, 0,09 cal / g pentru eter şi de 0,068 cal / g pentru mercur.

Cantitatea mare de apă pe care o conțin viețuitoarele se opune variațiilor de temperatură, contribuind, astfel, la termoreglarea animalelor homeoterme.

Capacitatea calorică mare a apei poate fi modificată de substanțele dizolvate în ea. Moleculele de apă din jurul ionilor se aşază cu polul negativ (oxigenul) spre ionii pozitivi şi cu polul pozitiv (hidrogenul) spre ionii negativi. Prezența ionilor determină rearanjarea moleculelor de apă şi dezorganizarea structurii lor microcristaline. În aceste condiții, încălzirea determină, cu mai mare uşurință, creşterea agitației moleculare, numărul legăturilor de hidrogen care trebuie desfăcute este mai mic, temperatura creşte mai repede, iar capacitatea calorică scade.

Dacă în apă sunt dizolvate molecule apolare, acestea au tendința de a accentua structura supramoleculară a apei. În jurul fiecărei molecule dizolvate, se formează o rețea mai densă de molecule de apă legate prin punți de hidrogen. Creşterea numărului de legături de hidrogen va determina creşterea capacității calorice.

Scanned with OKEN Scanner

În afară de mercur, apa este singura dintre toate lichidele care are cea mai mare tensiune superficială.

Cercetări recente au ajuns la concluzia că apa naturală distilată este formată din trei componente: apă neutrală: 998 de părți și 2 părți: apă biologică și apă antagonică. Proporția dintre apa biologică și apa antagonică este dependentă de proveniență. Se pare că izvoarele din zonele vulcanice conțin cel mai mare procentaj de apă biologică.

În natură, există posibilitatea de a se forma artificial sau natural următoarele forme de apă din: a) hidrogen ușor cu oxigen ușor; b) hidrogen ușor cu oxigen 17; c) hidrogen ușor cu oxigen 18; d) hidrogen greu cu oxigen ușor; e) hidrogen greu cu oxigen 17; f) hidrogen greu cu oxigen 18 și de asemenea, cu încă trei forme de apă radioactivă (combinații ale tritiului cu oxigen 16, 17 sau 18).

Apa biologică și apa antagonică nu se identifică cu formele de apă menționate mai sus; structura lor este polimoleculară și asimetrică; ele se structurează în formă de elice dublă cu atomii de oxigen legați pe generatoare și cei de hidrogen pe spirală, ceea ce reamintește de dubla elice a acidului dezoxiribonucleic.

Apa biologică are orientarea elicei într-o direcție, iar apa antagonică are orientarea elicei în sens invers.

Apa biologică are un pH care se apropie și uneori se identifică cu pH-ul celulei vii. Valoarea pH-ului variază de la 7,0 până la 8,5 – 9,0 (pH-ul mediului biologic este de 7,2 – 7,4). PH-ul apei antagonice este mult sub 5,5.

Proporțiile cantitative ale apei biologice și ale celei antagonice în diferitele organe dă pH-ul organului respectiv.

Se pare că apa din izvoarele zonei de păduri de fag este cea mai bună de băut. În această apă, concentrația de apă biologică și apă antagonică față de apa neurală este optimă pentru procesele biologice, ca și raportul dintre apa biologică și cea antagonică.

Picăturile de apă biologică văzute la microscop se constată că oscilează (pulsează). Frecvența acestor pulsații depinde de temperatură. Apa biologică fierbe la 105°C, îngheață mai jos de 0°C. Acest lucru este confirmat și de faptul că seva plantelor nu îngheață la 0°C. Seva plantelor conține multă apă biologică, dar când este extrasă, în contact cu atmosfera, se transformă. Celulele nu folosesc apa neutrală, ci apa biologică și apa antagonică.

Structura cristalelor de apă biologică și apă antagonică diferă de structura cristalelor de apă obișnuită.

Din punct de vedere electric, datorită vibrațiilor sale naturale, în soluțiile de apă biologică apar efecte de oscilație (pulsații electrice) cu maxime și minime de amplitudine. Oscilațiile continui ale apei biologice depind de

Scanned with OKEN Scanner

proprietatea ei esențială de a capta şi de a reemite instantaneu acea formă de energie care vehiculează în univers şi constituie izvorul energetic al întregii noastre existențe.

3.4. APA GREA

Apa obişnuită constă din molecule de genuri diferite, construite din hidrogen şi oxigen şi izotopii lor grei [^{17}O, ^{18}O, deuteriu (D = ^{2}H), tritiu (T = ^{3}H)] combinate în diferite feluri. Deoarece aceste molecule au însă proprietăți identice, exceptând masa, densitatea unei probe de apă este proporțională cu greutatea moleculară medie a moleculelor din ea. Dacă un eşantion de apă ar consta din oxigenul obişnuit combinat numai cu deuteriu, greutatea moleculară ar fi 28, în loc de 18 şi deci densitatea ar fi cu 10% mai mare decât cea a apei obişnuite. Termenul de *apă grea* se referă, de obicei, la această formă a apei.

Se poate prepara apă şi mai grea, izolând izotopul ^{18}O şi combinându-l cu deuteriul. Această apă are o densitate cu 20% mai mare decât a apei obişnuite. Există o formă şi mai grea de apă. Izotopul T=^{3}H combinat cu ^{18}O duce la o apă cu greutatea moleculară de 24, fiind cu 30% mai densă decât apa obişnuită.

Cea mai veche metodă practică de izolare a apei grele din apa obişnuită constă din electroliza acesteia din urmă în prezența acidului sulfuric sau a hidroxidului de sodiu. Din cauza supratensiunii mai mari a ionului de D^+ față de H^+, apa grea se electrolizează cu viteză mai mică decât apa uşoară şi, prin urmare, se concentrează în apa reziduală nereacționată. Dintr-o tonă de apă obişnuită, se obțin circa 10 cm^3 de apă grea, de puritate de 99,99 %.

Din apa grea, se poate prepara hidrogenul greu, D_2, prin electroliză sau prin oricare dintre metodele cunoscute de formare a hidrogenului din apă.

Proprietățile fizice ale apei grele se deosebesc destul de mult de ale apei obişnuite (tabelul 3.1.):

Tabelul 3.1.

Proprietățile fizice ale apei grele

Proprietatea fizică	H_2O	D_2O
Punct de topire	0,0°C	+3,80°C
Punct de fierbere	100,0°C	101,42°C
Presiune de vapori la 100° C, torr	760,0	721,2

Scanned with OKEN Scanner

Densitatea la 20^0C, g / cm^3	0,9982	1,1056
Temperatura la care densitatea este max.	4^0C	$11,6^0$C
Produs ionic la 25^0 C	1.10^{-14}	$0,16.10^{-14}$
Constanta dielectrică la 20^0 C	80,35	79,75
Căldura latentă de topire, cal / mol	1440	1510
Căldura de vaporizare la 25^0 C, cal /mol	10,484	10,743
Solubilitate: g NaCl în 100 g apă, la 25^0C	35,9	30,5

Pornind de la D_2 sau D_2O, se pot obține numeroase combinații chimice, care conțin în molecula lor deuteriu, de exemplu (2):

$$D_2 + Cl_2 \rightarrow 2DCl$$
$$SO_3 + D_2O \rightarrow D_2SO_4$$
$$Mg_3N_2 + 3\,D_2O \rightarrow MgO + 2\,NaD_3$$

De asemenea, au fost preparate numeroase combinații organice, conținând D în loc de H, de exemplu, CD_4, C_6D_6 etc. Toate aceste combinații ale deuteriului au proprietăți fizice puțin deosebite de combinațiile analoage ale hidrogenului ușor.

Viermii, peștii şi alte animale acvatice mor în apă grea pură, dar suportă o concentrație de apă grea mai mică de 32 % (2). Şoarecii suportă apa grea până ce aceasta atinge în corpul lor o concentrație de 20 %, după care mor, manifestând sete intensă când concentrația ajunge la 40 %. Semințele plantelor nu încolțesc în apă grea.

3.5. SOLUȚIILE ÎN APĂ

Apa este un solvent mult mai bun decât cele mai multe lichide. Multe săruri cristaline şi alți compuşi ionici se dizolvă în apă. Rețeaua cristalină a sărurilor este menținută de către atracțiile electrostatice foarte puternice dintre ionii pozitivi şi cei negativi. Pentru a separa acești ioni, este nevoie de o energie considerabilă. Apa dizolvă cu uşurință, de exemplu, clorura de sodiu, deoarece atracția electrostatică puternică dintre dipolii apei şi ionii de Na^+ şi Cl^-, care conduce la formarea ionilor de Na^+ şi Cl^- hidratați, foarte stabili, depăşeşte cu mult tendința de atracție a Na^+ şi Cl^- unul față de altul. Datorită constantei sale dielectrice foarte mari, apa tinde să compenseze atracția electrostatică dintre ionii pozitivi şi negativi.

Scanned with OKEN Scanner

Glucidele, alcoolii simpli etc. sunt uşor dizolvaţi de către apă, datorită tendinţei grupelor funcţionale polare, cum sunt grupele hidroxilice ale glucidelor şi alcoolilor sau a atomului de oxigen carbonilic al aldehidelor şi cetonelor, de a forma legături de hidrogen cu moleculele de apă (fig. 3.4.).

Apa dizolvă sau dispersează sub formă de micele (mici particule) mulţi compuşi care conţin grupe polare, cât şi grupe puternic nepolare (*compuşi amfipatici).* Un exemplu de compus amfipatic este oleatul de sodiu, care are o grupă puternic nepolară şi o grupă puternic polară. Acesta are o foarte slabă tendinţă de a se dizolva în apă şi de a forma o soluţie ionică adevărată. El se dispersează în apă cu uşurinţă, formând mici particule, în care grupele carboxil încărcate negativ formează legături de hidrogen cu moleculele de apă, iar lanţul hidrocarbonat nepolar, insolubil, nu formează legături de hidrogen cu apa. Mulţi componenţi celulari ca proteinele, acizii nucleici, lipidele polare sunt amfipatici.

La dizolvare, între moleculele substanţei dizolvate şi moleculele apei, se stabilesc interacţiuni şi, din această cauză, proprietăţile fizice şi chimice ale soluţiilor sunt diferite de cele ale apei, ca şi de cele ale substanţei dizolvate.

Prezenţa substanţelor dizolvate produc modificarea structurii şi proprietăţilor apei lichide. În cazul clorurii de sodiu dizolvate în apă, de exemplu, ionii de Na^+ şi Cl^- se înconjoară cu dipoli de apă şi geometria aşezării moleculelor de apă, în comparaţie cu aceea din apa pură, se modifică mult. Această modificare este cu atât mai accentuată, cu cât concentraţia în sare dizolvată este mai mare.

Substanţele dizolvate produc asupra solventului scăderea punctului de îngheţare, creşterea punctului de fierbere sau scăderea presiunii de vapori. Dacă se dizolvă o moleculă gram dintr-o substanţă ideală, care nu disociază, nu se asociază şi nu este volatilă, dizolvată într-o 1 000 g de apă la presiunea de 760 mm Hg, scade punctul de îngheţare cu 1,86°C şi creşte punctul de fierbere cu 0,543°C.

Substanţele dizolvate conferă soluţiilor proprietatea de a avea presiune osmotică. Presiunea osmotică este o proprietate a soluţiilor, legată de cantitatea de substanţă dizolvată în 1 000 cm^3 de apă, nedepinzând de masa moleculară sau sarcina electrică a acesteia (4).

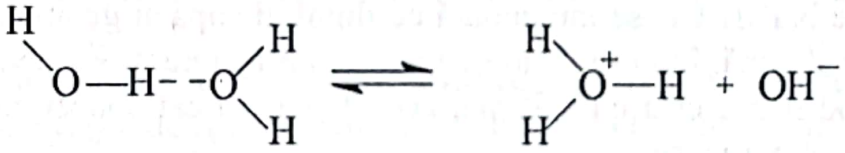
Dacă se dizolvă o moleculă gram de substanţă neionizabilă în 1 000 cm^3 de apă şi această soluţie se pune în contact, printr-o membrană permeabilă numai pentru moleculele de apă, cu apa distilată, se constată că soluţia are tendinţa de a-şi mări volumul cu o forţă de 22,4 atm. Această forţă poartă denumirea de *presiune osmotică.*

Scanned with OKEN Scanner

Presiunea osmotică are o valoare de 22,4 atm, deoarece o moleculă gram de gaz ocupă la 0°C, 22,4 l. Dacă volumul se reduce la un litru, produsul pv fiind constant, urmează că presiunea va fi de 22,4 atm.

3.5.1. ACIDITATEA ŞI ALCALINITATEA SOLUŢIILOR

Apa pură este neutră. Deşi molecula de apă este formată prin legături covalente, o cantitate mică de molecule este ionizată. Atomul de hidrogen cu masa sa moleculară atât de mică are un singur electron care este puternic atras de atomul de oxigen. Ionul de hidrogen are o oarecare tendinţă de a se disocia de atomul de oxigen, de care este legat covalent în molecula de apă şi de a se deplasa, când energia internă a fiecărei molecule este favorabilă, spre atomul de oxigen al moleculei de apă învecinate, de care se leagă printr-o legătură de hidrogen. Moleculele ionizate conferă apei o concentraţie în OH^- egală cu concentraţia în H^+. Ionul de hidrogen este captat de o moleculă de apă, iar ionizarea apei se poate scrie astfel:



În această reacţie, se produc doi ioni, ionul de hidroniu (H_3O^+) şi ionul hidroxil (OH^-). Într-un litru de apă pură la 25°C, în orice moment, există $1{,}0 \cdot 10^{-7}$ moli de ioni de H_3O^+ şi o cantitate egală de ioni OH^-.

Gradul de ionizare este influenţat de temperatură. Dacă temperatura creşte, numărul moleculelor ionizate este din ce în ce mai mare, determinând o creştere a concentraţiei în H^+ şi OH^-.

De concentraţia în ioni depinde conductibilitatea electrică. Măsurători foarte exacte arată că în apa pură, la 25°C, raportul dintre produsul concentraţiilor în H^+ şi OH^- şi concentraţia în molecule neionizate este de $1{,}8 \cdot 10^{-16}$:

$$K = \frac{C_{H^+} \cdot C_{OH^-}}{C_{H_2O}} = 1{,}8 \cdot 10^{-16}$$

unde K este constanta de ionizare.

Constanta de ionizare este extrem de mică, ceea ce înseamnă că numărul moleculelor ionizate este foarte mic față de numărul moleculelor neionizate. Din această cauză, concentrația moleculelor neionizate poate fi considerată constantă. Cum concentrația molară a apei este de 55,56 molecule gram la un volum de un litru, rezultă că:

$$C_{H^+} \cdot C_{OH^-} = K \cdot C_{H_2O} = 1,8 \cdot 10^{-16} \cdot 55,56 = 1 \cdot 10^{-14}$$

Produsul concentrației ionilor sau *produsul ionic* al apei este de 1.10^{-14} la 25°C.

Dacă în apă se dizolvă un acid tare,

$$AH \rightarrow H^+ + A^-,$$

creşte concentrația molară a ionilor de hidrogen şi scade concentrația în ioni de hidroxil, deoarece produsul ionic al apei rămâne constant pentru aceeaşi temperatură.

Dacă în apă se dizolvă o bază tare,

$$BH \rightarrow B^+ + OH^-,$$

creşte concentrația în ioni de hidroxil, deci scade concentrația în ioni de hidrogen.

Disocierea apei este un proces în echilibru:

$$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$$

a cărui constantă de echilibru este:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

parantezele indicând concentrația în moli la litru.

Mărimea constantei de echilibru, la o temperatură dată, poate fi calculată prin determinările de conductivitate a apei distilate pure. Concentrația în apă a apei pure este foarte mare şi ea se consideră egală cu numărul de grame de apă dintr-un litru împărțit la masa moleculară a apei, adică, 1 000 / 18 = 55,5 M. Deoarece concentrația ionilor de H^+ şi OH^- este foarte mică, de 1.10^{-7} la 25°C, concentrația molară a apei nu este modificată semnificativ de

Scanned with OKEN Scanner

către slaba ei ionizare. Expresia constantei de echilibru poate fi simplificată astfel:

$$55{,}5\ K = [H^+]\ [OH^-]$$

iar termenul 55,5 K poate fi înlocuit printr-o constantă generală K_w, numită *produsul ionic* al apei şi formula de mai sus devine:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Valoarea K_w la 25°C este de $1{,}0.10^{-14}$. Într-o soluție acidă, concentrația H^+ este relativ mare, iar concentrația OH^- scăzută corespunzător. Într-o soluție alcalină situația este inversă. K_w, produsul ionic al apei, stă la baza scării de pH (tabelul 3.2.) (1).

Tabelul 3.2.

Scara de pH

$[H^+]$, M	pH	$[OH^-]$, M
1,0	0	10^{-14}
10^{-1}	1	10^{-13}
10^{-2}	2	10^{-12}
10^{-3}	3	10^{-11}
10^{-4}	4	10^{-10}
10^{-5}	5	10^{-9}
10^{-6}	6	10^{-8}
10^{-7}	7	10^{-7}
10^{-8}	8	10^{-6}
10^{-9}	9	10^{-5}
10^{-10}	10	10^{-4}
10^{-11}	11	10^{-3}
10^{-12}	12	10^{-2}
10^{-13}	13	10^{-1}
10^{-14}	14	1,0

Scanned with OKEN Scanner

S.P.L. Sörensen a definit termenul de *pH* ca:

$$pH = lg_{10} \frac{1}{[H^+]} = - lg_{10} [H^+]$$

Într-o soluție complet neutră, la 25°C:

$$[H^+] = [OH^-] = 1 \cdot 10^{-7} M$$

pH-ul unei astfel de soluții este:

$$pH = lg \frac{1}{1 \cdot 10^{-7}} = 7,0$$

După J. N. Brönsted şi T. M. Lowry, un acid este un donor de protoni şi o bază este un acceptor de protoni (fig. 3.6.).

Figura 3.6.

Perechi de acid – bază conjugate

CH_3COOH	$\leftrightarrow$	H^+	+	CH_3COO^-
H_2PO_4	$\leftrightarrow$	H^+	+	HPO_4^{2-}
NH_4^+	$\leftrightarrow$	H^+	+	NH_3
HOH	$\leftrightarrow$	H^+	+	OH^-

O reacție acid – bază implică întotdeauna o pereche acid – bază conjugată, formată dintr-un donor de protoni şi un acceptor de protoni. De exemplu, acidul acetic este un donor de protoni, iar ionul acetat este un acceptor de protoni.

Ionizarea unui acid (HA) în soluție apoasă diluată implică transferul unui proton de la acid la apă, care acționează ca acceptor de protoni, pentru a forma acidul H_3O^+ :

$$HA + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + A^-$$

Acizii care au o slabă tendință de a elibera protoni în apă sunt acizi slabi, iar acizii care eliberează protoni cu uşurință sunt acizi tari.

Acțiunea de disociere a oricărui acid este exprimată prin constanta de disociere, la o anumită temperatură:

Scanned with OKEN Scanner

$$K = \frac{[H^+]\,[A^-]}{[HA]\,[H_2O]}$$

unde parantezele indică concentrația în moli la litru. Se obișnuiește să se simplifice această expresie prin eliminarea apei necesare pentru hidratarea unui proton (1):

$$K = \frac{[H^+]\,[A^-]}{[HA]}$$

Constantele de disociere ale soluțiilor apoase ale diferitelor substanțe la o anumită concentrație și tărie ionică se numesc *constante aparente* sau *constante de disociere pentru concentrație* și se notează cu K′ pentru a se deosebi de adevărata constantă sau *constanta de disociere termodinamică* K (1). Se menționează expresia pK′, care reprezintă o exprimare logaritmică a lui K, așa cum termenul pH este transformarea logaritmică a lui $[H^+]$:

$$pK' = \lg \frac{1}{K'} = -\lg K'$$

Constantele de disociere aparentă ale unor acizi și baze sunt trecute în tabelul 3.3. (1).

Tabelul 3.3.

Constante de disociere aparentă, K′ și pK′ unor acizi și baze

Acidul sau baza	K′ . M	pK′
HCOOH	$1{,}78 \cdot 10^{-4}$	3,75
CH_3COOH	$1{,}74 \cdot 10^{-5}$	4,76
CH_3CH_2COOH	$1{,}35 \cdot 10^{-5}$	4,87
$CH_3CHOHCOOH$	$1{,}38 \cdot 10^{-4}$	3,86
H_3PO_4	$7{,}24 \cdot 10^{-3}$	2,14
H_2CO_3	$1{,}70 \cdot 10^{-4}$	3,77
NH_4^+	$5{,}62 \cdot 10^{-10}$	9,25
$CH_3NH_3^+$	$2{,}46 \cdot 10^{-11}$	10,6

Scanned with OKEN Scanner

3.6. APA CA SOLVENT

Apa este cel mai important dintre toţi solvenţii din natură sau utilizaţi în tehnică. Apa dizolvă electroliţi (acizi, baze, săruri), formând soluţii în care aceşti compuşi sunt în stare ionizată. De asemenea, apa dizolvă numeroase substanţe organice şi anorganice, care conţin atomi capabili de a forma legături de hidrogen cu moleculele apei (2).

În soluţii apoase, au loc numeroase reacţii. Se menţionează doar reacţiile biochimice din organismele vii, care, în ansamblul larg, constituie viaţa.

Sărurile sunt solubile în apă şi insolubile în majoritatea solvenţilor organici, deoarece apa are o constantă dielectrică foarte mare (circa 80 la temperatura camerei) şi moleculele sale tind să se combine cu ionii pentru a forma hidraţi. Aceste două proprietăţi sunt legate de momentul electric de dipol mare a moleculei de apă.

Forţele de atracţie sau repulsie ale sarcinilor electrice sunt invers proporţionale cu constanta dielectrică a mediului care înconjoară sarcinile. De aceea, două sarcini electrice opuse aflate în apă se atrag reciproc cu o forţă de 80 de ori mai mică decât cea corespunzătoare în aer sau în vid. Astfel, de exemplu, ionii unui cristal de clorură de sodiu în apă se vor disocia mult mai uşor din cristal decât dacă cristalul ar fi în aer, deoarece forţa electrostatică care aduce înapoi un ion pe suprafaţa cristalului, în soluţie apoasă, este de numai 1/80 din cea corespunzătoare în aer (3).

Stabilizarea ionilor dizolvaţi în apă se datorează formării hidraţilor ionilor. Fiecare ion negativ atrage capetele pozitive ale moleculelor de apă adiacente şi tinde să reţină câteva molecule de apă. Ionii pozitivi, care, de obicei, sunt mai mici decât ionii negativi, manifestă acest efect şi mai puternic: fiecare ion pozitiv atrage capetele negative ale moleculelor de apă şi leagă strâns de ele diferite molecule, formând un hidrat (3), care poate avea stabilitate considerabilă, în special, la cationii bivalenţi şi trivalenţi. Numărul moleculelor de apă care se ataşează la un cation este determinat de mărimea cationului. Cationul Be^{2+} formează un tetrahidrat, $Be(H_2O)_4^{2+}$, ioni ceva mai mari ca Mg^{2+}, Al^{3+} formează hexahidraţi, $Mg(H_2O)_6^{2+}$ sau $Al(H_2O)_6^{3+}$.

Forţele dintre cationi şi moleculele de apă sunt deosebit de puternice, motiv pentru care ionii din cristale deseori reţin un strat de molecule de apă, numit *apă de cristalizare*. Acest efect este mai pronunţat la ionii bivalenţi şi trivalenţi: $BeCO_3.4\ H_2O$; $BeSO_4.4\ H_2O$; $MgCl_2.6\ H_2O$; $MgSiF_6.6\ H_2O$; $AlCl_3.6\ H_2O$; $KAl\ (SO_4)_2.12\ H_2O$; $FeCl_3.6H_2O$ etc. În alaun, $KAl(SO_4)_2.\ 12$

Scanned with OKEN Scanner

H_2O, şase din cele 12 molecule de apă sunt coordinate în jurul ionului de aluminiu, iar celelalte şase, în jurul ionului de potasiu.

Hidratarea se datorează formării unor legături de hidrogen în cazul substanţelor neionice sau a unor atracţii ion – dipoli, când solvitul este compus din ioni.

În soluţiile compuşilor ionici, ionii de semn contrar rămân, în mare măsură, despărţiţi, în primul rând, din cauza constantei dielectrice mari a apei şi a puterii mari a acesteia de a solvata ionii. Fiecare ion se înconjoară cu o atmosferă de molecule de apă. Moleculele de apă, datorită momentului lor electric (μ = 1,84 D), sunt orientate, în cazul cationilor, cu oxigenul (polul negativ) spre ion, iar în cazul anionilor, cu atomul de hidrogen (polul pozitiv) spre ion. În aceste interacţii, solvit – solvent, se degajă călduri de hidratare însemnate.

Un ion se solvatează cu atât mai puternic, cu cât volumul ionului este mai mic şi sarcina electrică mai mare.

Hidraţii. Purificarea unor substanţe solide se poate face prin cristalizarea dintr-un solvent, depunându-se în formă anhidră sau sub formă de cristale care conţin *apă de cristalizare*. Substanţele care conţin apă de cristalizare se numesc *hidraţi*. Din apă cristalizează în stare anhidră puţine substanţe, dintre care unele halogenuri (NaCl, NaBr, KI, CsI), substanţe organice ca zaharina etc. Majoritatea electroliţilor şi multe substanţe neionice, anorganice şi organice, formează hidraţi. Hidraţii sunt stabili numai în stare solidă. Prin îndepărtarea apei, se transformă în substanţe anhidre, iar reţeaua cristalină a hidraţilor se năruieşte. Moleculele de apă de cristalizare fac parte integrantă din reţelele cristaline ale hidraţilor. Hidraţii compuşilor macromoleculari (proteinele, silicaţii) includ apă în interstiţiile reţelei lor, care, în unele cazuri, se dilată, fără a se modifica esenţial.

Higroscopicitate. Delicvescenţă. Eflorescenţă. Dacă se lasă clorură de calciu anhidră ($CaCl_2$) la aer, fiind o substanţă *higroscopică*, absoarbe vapori de apă din atmosferă, trecând în $CaCl_2.H_2O$, apoi în $CaCl_2.2\ H_2O$ şi apoi în $CaCl_2.6\ H_2O$. Unii hidraţi, printre care şi $CaCl_2.6\ H_2O$, lăsaţi la aer, continuă să absoarbă apă, transformându-se într-o soluţie concentrată. Asemenea substanţe sunt *delicvescente* (*5*).

Hidraţii bogaţi în apă, cum este $Na_2SO_4.10\ H_2O$ sau $Na_2CO_3.10\ H_2O$ lăsaţi la aer, pierd o parte din apa lor de cristalizare, iar cristalul se distruge, transformându-se într-o pulbere, se produce *eflorescenţă.*

Proprietatea unei substanţe de a fi delicvescentă sau eflorescentă la aer este determinată de presiunea vaporilor de apă din atmosferă, presiunea de vapori a hidratului şi presiunea de vapori a soluţiei saturate. O substanţă este delicvescentă când presiunea de vapori a soluţiei saturate este mai mică de-

Scanned with OKEN Scanner

cât a vaporilor de apă din atmosferă. Hidratul unei substanțe devine efloresccent când presiunea lui de vapori este mai mare decât cea a vaporilor de apă din atmosferă (2).

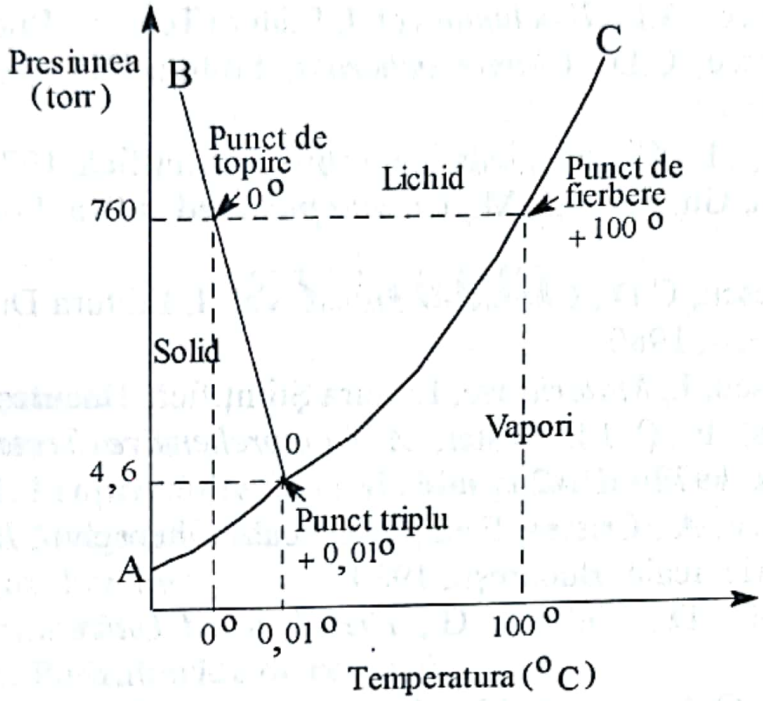


Fig.3.7. Diagrama de faze apă – gheață – vapori

Echilibrul gheață – apă – vapori. Sub temperatura de 0°C, presiunea de vapori a apei (gheții) este mică şi continuă să scadă cu temperatura. Diagrama de fază apă – gheață – vapori (fig. 3.7.) conține trei curbe de echilibru (OA, OB şi OC) care delimitează cele trei faze posibile ale sistemului: solid – lichid – vapori. Pentru fiecare presiune dată, sistemul este în echilibru numai la o anumită temperatură. Aşa de exemplu, pentru presiunea de 760 torr, temperatura de echilibru gheață – apă este 0°C, iar temperatura de echilibru apă–vapori este de 100°C.

Curba OA reprezintă echilibru gheață – vapori. După cum se vede din diagramă, la diferite temperaturi şi presiuni interdependente, pot exista câte două faze în echilibru: solid – lichid, lichid – vapori sau solid – vapori. Există un singur punct, *punctul triplu*, la care pot coexista cele trei faze: gheață, apă şi vapori. La apă, punctul triplu este la 0,01°C şi 4,6 torr (2).

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă:

1. Lehninger, A.L., *Biochimie*,vol. I, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987
2. Nenițescu, C.D., *Chimie generală*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1979
3. Pauling, L., *Chimie generală*, Editura Ştiințifică, 1972
4. Chiriță, Gh., Chiriță, M., *Chimia pielii*, ed. a II-a, Editura I.P. Iaşi, 1987
5. Nenițescu, C.D., *Chimie organică*, vol. I, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980
6. Cotăescu, I., *Materia vie*, Editura Ştiințifică, Bucureşti, 1968
7. Franks, F. (Ed.), Water, *A Comprehensive Tretease*, Plenum Press, New York, 1972 – 1982
8. Popescu, A., Cristea, E., Zamfirescu – Gheorghiu, *Biochimie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1980
9. Neufeld, D., Melnick, G., *The Harvard University Gazette*, 23 April 1998
10. Jones, O.A., Lester, J.N., Voulvoulis, N., *Biotechnology*, 23 (4), p. 163, 2005

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

ZAHARURI

4.1. Introducere 143
4.2. Monozaharide 144
4.2.1. Proprietăţile fizice şi chimice ale monozaharidelor 149
4.2.2. Monozaharide mai importante 151
4.3. Oligozaharide 152
4.4. Polizaharide 155
4.4.1. Polizaharide de rezervă 156
4.4.2. Polizaharide de structură 159
4.5. Glicoproteide 163
4.5.1. Mucopolizaharide 166
4.5.1.1. Acidul hialuronic 166
4.5.1.2. Condroitina, Condroitin 4 sulfatul, Condroitin 6 sulfatul 167
4.5.1.3. Sulfatul de dermatan 168
4.5.1.4. Heparina, Sulfatul de heparină 169
4.5.1.5. Sulfatul de keratan 170
4.5.1.6. Hidratarea mucopolizaharidelor 170

Bibliografie *173*

4.1. INTRODUCERE

Zaharurile sau zaharidele sau glucidele sau hidraţii de carbon sunt o clasă de polihidroxi–aldehide, polihidroxi–cetone şi unii derivaţi ai acestora. Denumirea de *hidraţi de carbon* vine de la faptul că principalii reprezentanţi ai clasei, ca de exemplu, glucoza, $C_6H_{12}O_6$, sau celuloza $(C_6H_{10}O_5)$, au formula generală $C_n(H_2O)_m$ a unor presupuşi hidraţi de carbon.

Hidraţii de carbon sunt cea mai răspândită materie organică din biosferă, datorită abundenţei din lumea plantelor a celor doi polimeri ai D–glucozei, amidonul şi celuloza. În cele mai multe plante, amidonul este forma principală de stocare a energiei, iar celuloza este componentul principal structural extracelular din pereţii rigizi ai celulelor ţesuturilor fibroase şi lemnoase.

Glicogenul, care are o structură asemănătoare cu a amidonului, este principalul hidrat de carbon de rezervă la animale. Alte polizaharide sunt componente ale învelişurilor moi ale ţesuturilor animale şi ale peretelui celular bacterian.

Hidraţii de carbon se împart în: *monozaharide, oligozaharide* şi *polizaharide.*

4.2. MONOZAHARIDE

Monozaharidele sau hidroxi–aldehidele sau hidroxi–cetonele au grupa carbonil, în parte, modificată, prin formare de semiacetali interni.

Monozaharidele pot fi considerate ca produşi de oxidare ai poliolilor alifatici simpli ca: glicerolul ($CH_2OH–CHOH–CH_2OH$), tetritolii [$CH_2OH–(CHOH)–(CHOH)_2–CH_2OH$], pentitolii [$CH_2OH–(CHOH)_3–CH_2OH$] şi hexitolii [$CH_2OH–(CHOH)_4–CH_2OH$], în care o grupă de alcool primar este oxidată la aldehidă sau una de alcool secundar la cetonă. După această definiţie, cea mai simplă monozaharidă este *glicolaldehida* ($HOCH_2CHO$).

După numărul de atomi de carbon din moleculă, monozaharidele se împart în *trioze, tetroze, pentoze, hexoze* etc.

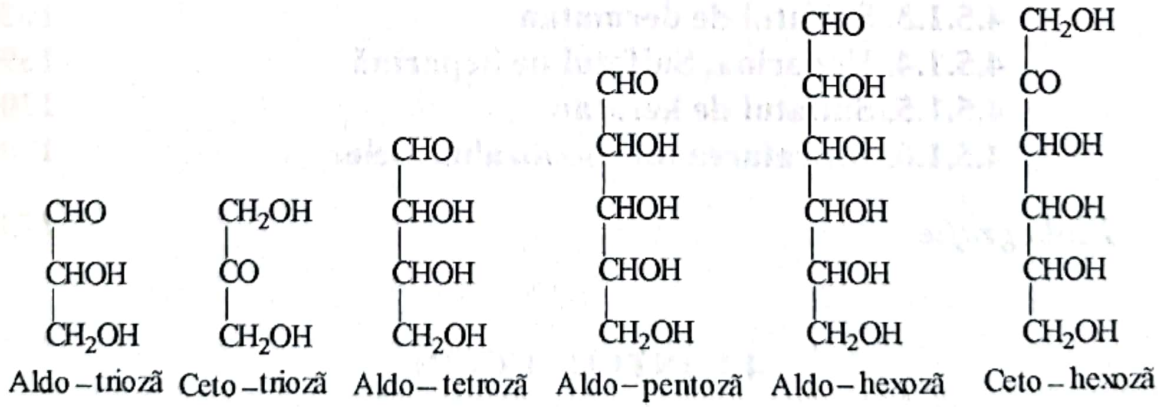


Fig. 4.1. Aldoze şi cetoze

După funcţia grupei carbonil, se disting *aldoze* şi *cetoze*. De la glicerol va deriva o aldo–triază, *glicerolaldehida* şi o ceto–triază, *dihidroxiacetona*. În mod asemănător, de la poliolii mai înalţi, rezultă aldoze şi cetoze (fig. 4.1.).

Scanned with OKEN Scanner

Fiecare grupă CHOH din formulele prezentate în fig. 4.1. are atomul de carbon asimetric. Pentru fiecare atom de carbon asimetric, vor exista doi enantiomeri. În cazul de față, vor fi 2 aldo-trioze, 4 aldo-tetroze, 8 aldo-pentoze, 16 aldo-hexoze stereoizomere.

Întrucât cetozele au cu un atom de carbon asimetric mai puțin decât aldozele, vor exista deci o ceto-trioză, 2 ceto-tetroze, 4 ceto-pentoze şi 8 ceto-hexoze. În fig. 4.2., sunt prezentate formulele aldozelor din seria D şi, în mod analog, se poate deduce schema pentru seria L, precum şi formulele seriilor D şi L pentru cetoze (1).

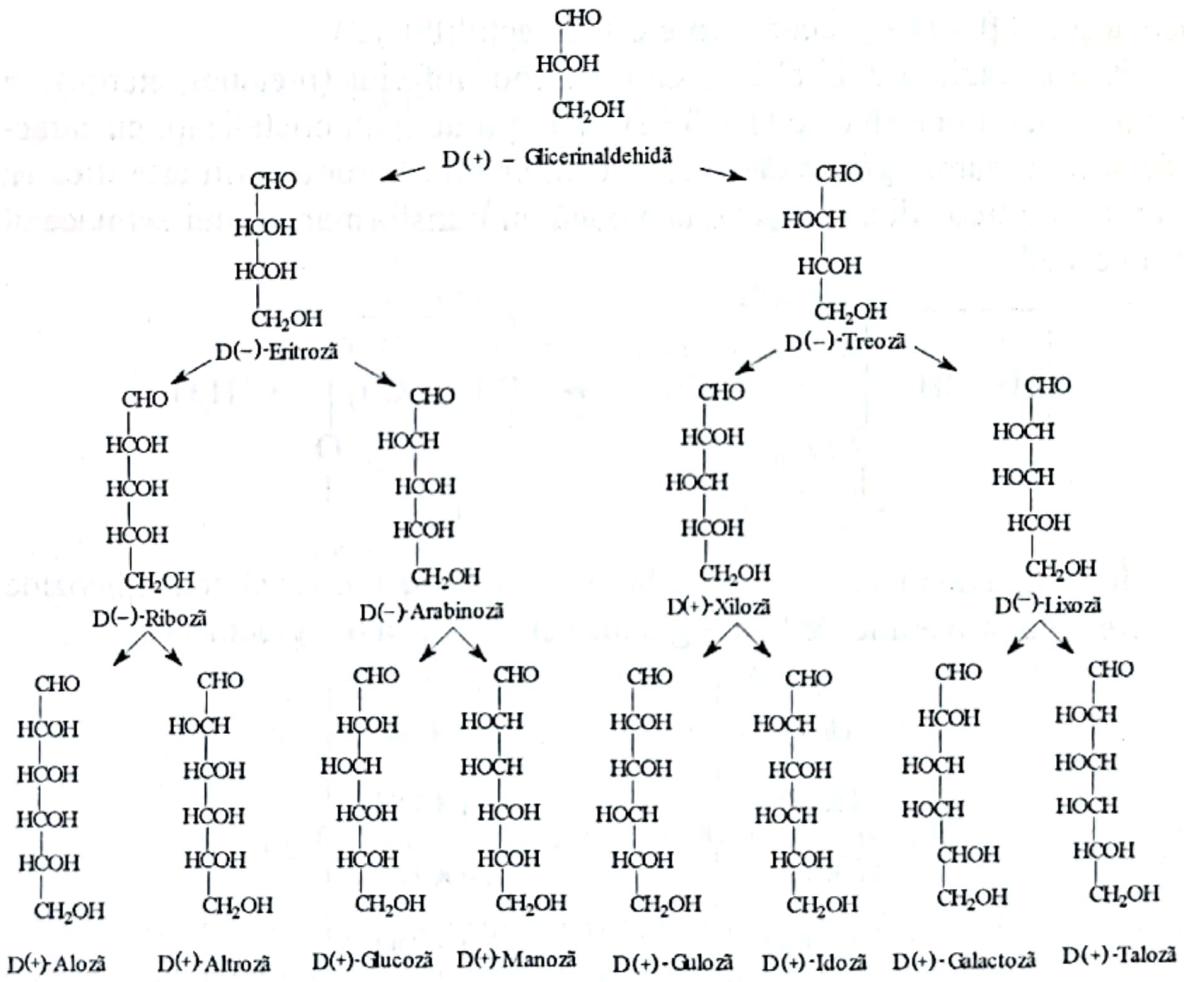


Fig. 4.2. Seria D a aldozelor

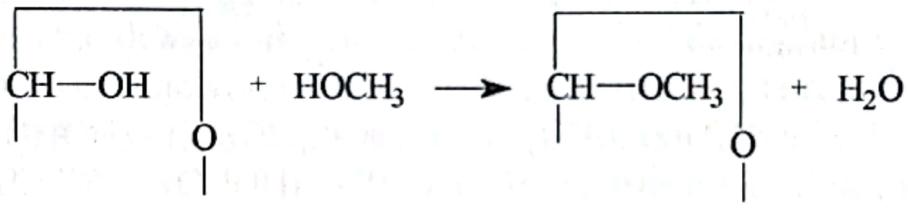
Glicerinaldehida şi tetrozele nu se găsesc în natură. Triozele şi heptozele sunt intermediari însemnați în metabolismul glucidic. Pentozele şi hexozele sunt cele mai importante dintre monozaharide. Unele dintre ele se găsesc în natură în stare liberă sau combinată, în cantități uriaşe. Aldopentozele sunt componente ale acizilor nucleici şi ale diferitelor polizaharide.

Scanned with OKEN Scanner

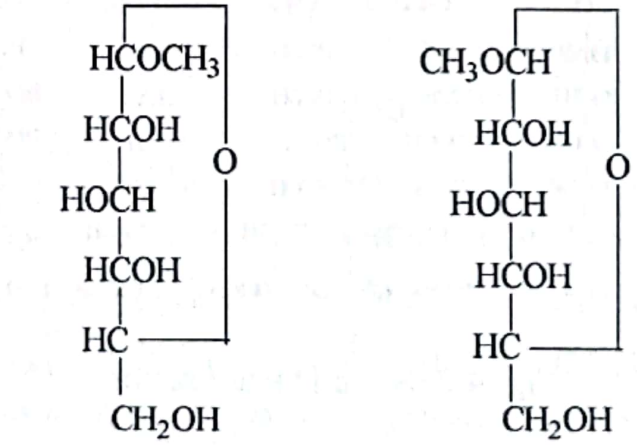
În soluție apoasă, monozaharidele se comportă ca și cum ar avea un centru de asimetrie în plus față de cel prezentat în formulele structurale din fig. 4.2.

D–glucoza poate exista în două forme izomere, care diferă prin rotația specifică, α – D – glucoza cu $[\alpha]^{20}_D = +122{,}2°$ și β – D – glucoza cu $[\alpha]^{20}_D = +18{,}7°$. Cei doi izomeri au aceeași compoziție elementară, dar proprietățile lor fizice și chimice sunt diferite. Când izomerii α și β ai D–glucozei sunt dizolvați în apă, rotația optică a fiecăruia se modifică treptat și se ajunge la un echilibru la valoarea $[\alpha]^{20}_D = +52{,}7°$; are loc schimbarea numită *mutarotație*, care se datorează formării, la 20°C, a unui amestec de 1/3 α – D – glucoză și 2/3 β – D – glucoză, care este în echilibru (2).

Prin încălzirea unei aldoze cu un alcool inferior (metanol, etanol), în prezența acidului clorhidric (1 – 3 %), se obțin derivați cristalizați, cu caracter de acetali, numiți *glicozide*. Aceste combinații se produc prin esterificarea hidroxilului glicozidic, o reacție analoagă cu transformarea unui semiacetal într-un acetal:



În reacția de mai sus, aplicată la D–glucoză, se formează două glicozide izomere, una provenind de la α – glucoză și alta de la β – glucoză (1):



α – Metilglicozidă β – Metilglicozidă

Din considerații chimice, s-a ajuns la concluzia că izomerii α și β ai D – glucozei nu au o structură deschisă ca în fig. 4.2., ci una ciclică, formată prin reacția grupării hidroxil de la carbonul 5 cu gruparea aldehidică de la

carbonul 1. Ciclul din şase atomi de carbon ce se formează poartă numele de *ciclu piranozic*, de la compusul heterociclic *piran.*

Numele ciclului de α –D – glucoză este *α–D–glucopiranoză* (Fig. 4.3). Formarea ciclului de piranoză este rezultatul unui tip mai general de reacţie dintre o aldehidă şi un alcool, ducând la obţinerea unui *semiacetal,* care conţine un atom de carbon asimetric şi deci poate exista sub două forme stereoizomere denumite α şi β (fig. 4.4.).

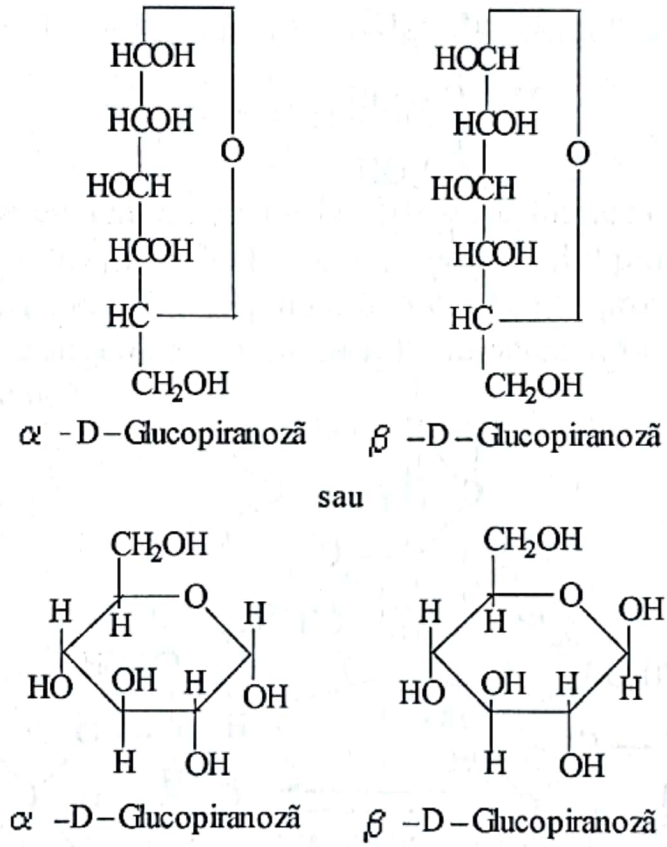


Fig. 4.3. Formele α şi β ale D–glucopiranozei

În structura rezultată, grupa carbonil este mascată şi, în locul ei, apare o nouă grupă hidroxil, numită *hidroxil glicozidic.*

Formele izomere ale monozaharidelor, care diferă doar prin configuraţia atomului de carbon carbonilic, se numesc *anomeri,* iar atomul de carbon, *carbon anomeric.*

Semicetalul este produsul rezultat din reacţia dintre o cetonă şi un alcool. În cetonele cu cinci sau mai mulţi atomi de carbon, gruparea hidroxil de la atomul de carbon 5 reacţionează cu gruparea carbonilică de la atomul de carbon 2, formând un ciclu de cinci atomi de carbon, *ciclul furanozic* derivat al furanului. Ciclul format de D – fructoză este α – *D–fructofuranoză* (fig. 4.5).

Scanned with OKEN Scanner

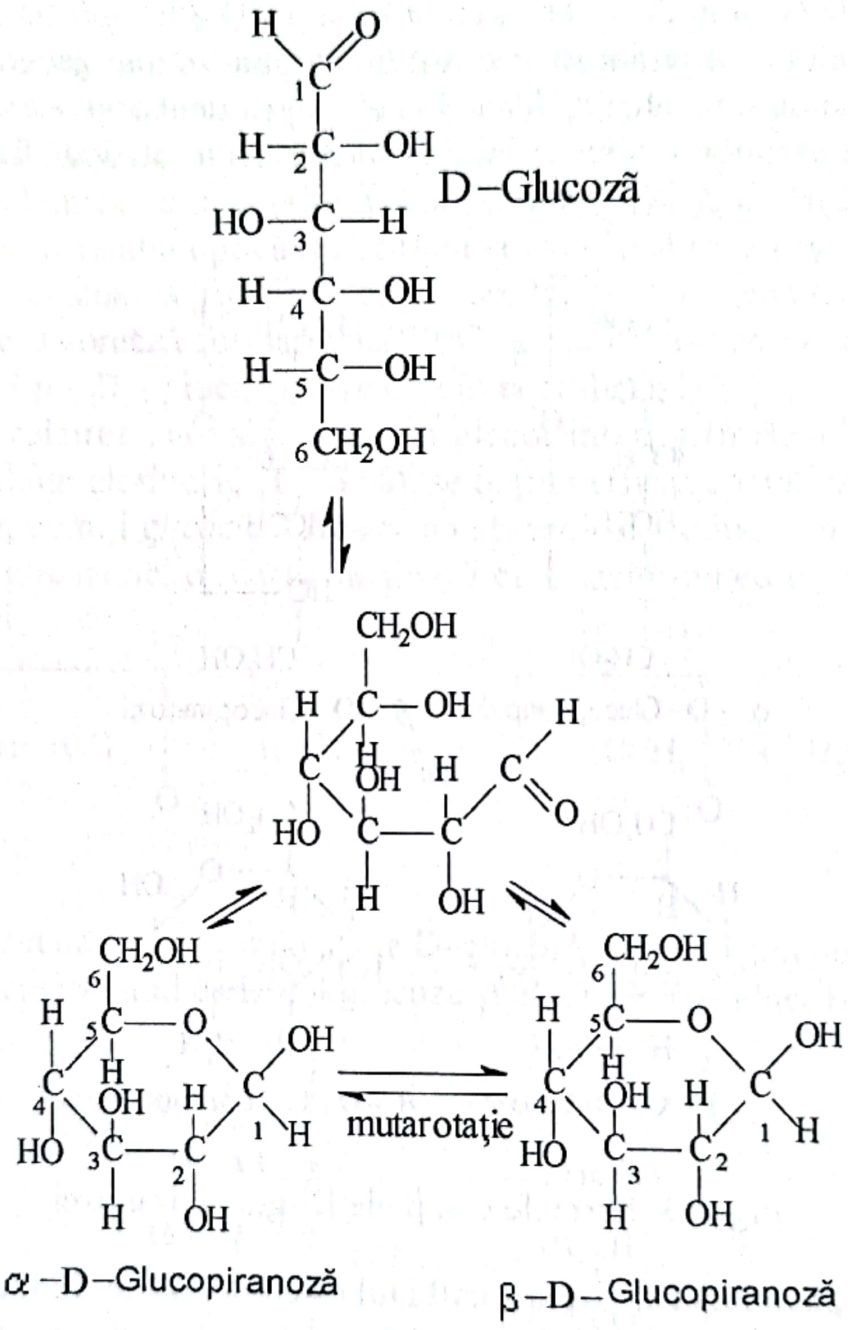
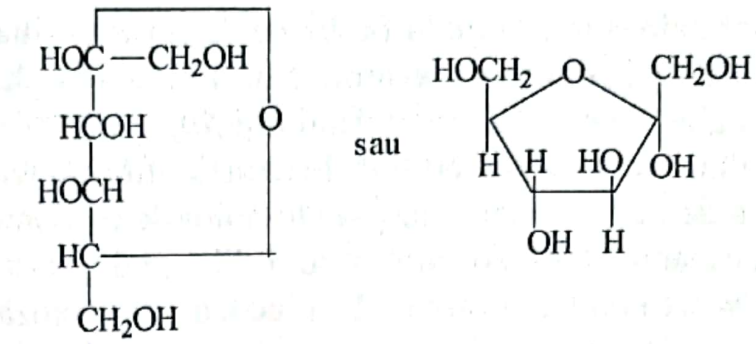


Fig. 4.4. Formarea ciclului piranoză la glucoză

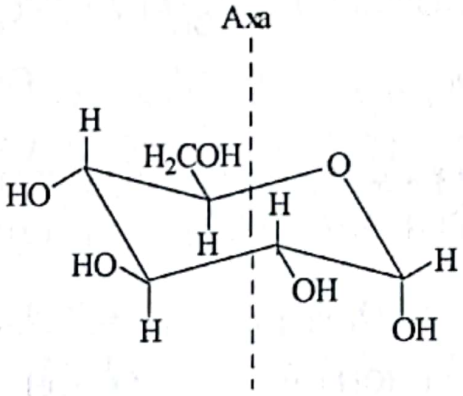
Scanned with OKEN Scanner



α – D – Fructofuranozã α – D – Fructofuranozã

Fig. 4.5. Ciclul furanozic

Pentru a se evidenţia structurile ciclice ale monozaharidelor s-au adoptat *formulele de proiecţie* W.N. Haworth, în care ciclul piranozic sau furanozic este imaginat perpendicular pe planul hârtiei. Aceste proiecţii sunt întrucâtva eronate, deoarece sugerează că ciclurile furanozice şi piranozice sunt plane, ceea ce nu este exact:



α–D–Glucopiranozã

4.2.1. PROPRIETĂŢILE FIZICE ŞI CHIMICE ALE MONOZAHARIDELOR

Monozaharidele şi, mai ales, pentozele şi hexozele sunt substanţe incolore, cristalizate şi nu pot fi distilate fără descompunere. Derivaţii lor, în care grupele hidroxilice sunt blocate, cum sunt eterii metilici, pot fi distilaţi la vid.

Din cauza numeroaselor grupe hidroxilice din moleculă, monozaharidele sunt uşor solubile în apă, greu solubile în alcool etilic şi insolubile în eter etilic, cloroform şi în hidrocarburi.

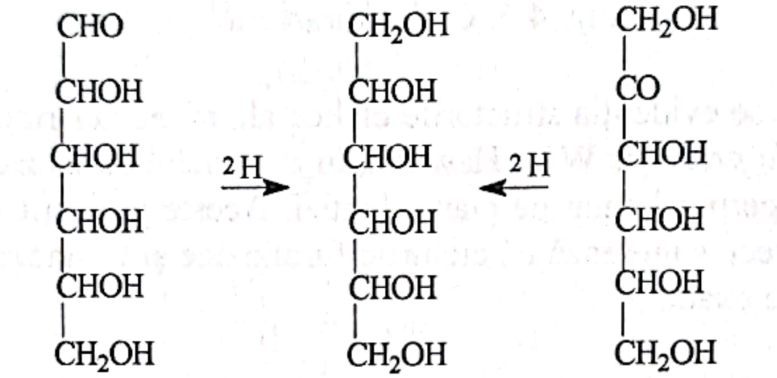
Scanned with OKEN Scanner

Monozaharidele sunt stabile la fierberea cu soluții diluate de acizi minerali, iar soluțiile acide concentrate produc deshidratarea glucidelor cu formare de derivați aldehidici de la furan denumiți *furfurali*.

Soluțiile diluate de baze determină, la temperatura camerei, o rearanjare în jurul atomului de carbon anomeric și a atomului de carbon adiacent.

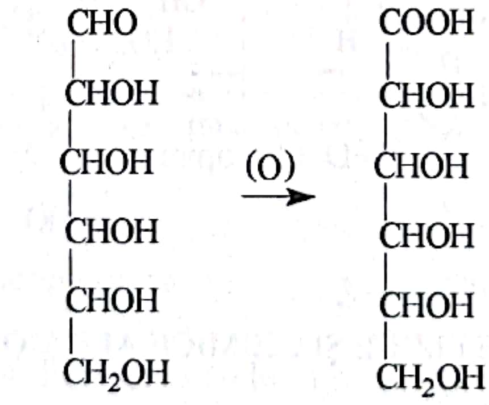
Astfel, la tratarea D–glucozei cu soluții diluate de baze duce la izomerizarea sa, cu formarea unui amestec de D–glucoză, D–fructoză și D–manoză.

Monozaharidele, prin reducere, se transformă în alcooli polihidroxilici. Din tetroze, se formează *tetritoli*, din pentoze, *pentitoli*, din hexoze, *hexitoli*:



Aldo – hexoză Hexitol Ceto – hexoză

La tratarea blândă a aldozelor cu apă de clor sau de brom, se oxidează grupa aldehidică și se obțin *acizi aldonici*:



Aldo – hexoză Acid aldonic

Din D–glucoză, prin oxidare, se obține *acidul gluconic*, din manoză, *acidul manonic*. Acizii aldonici dau reacțiile specifice hidroxiacizilor alifatici. În apă, sunt ușor solubili, la fel și sărurile lor. *Gluconatul de calciu* este utilizat ca medicament.

Scanned with OKEN Scanner

Oxidarea energică a aldozelor cu acid azotic concentrat duce la acizi dicarboxilici (*acizi zaharici*), în care cei doi atomi de carbon terminali ai aldozei sunt transformaţi în carboxili. Acizii zaharici proveniţi de la aldohexoze [HOOC – $(CHOH)_4$ – COOH] se deosebesc între ei prin configuraţia sterică.

Hidroxilul glicozidic al monozaharidelor *se eterifică* prin tratare cu alcool etilic, în prezenţa unei mici cantităţi de acid clorhidric gazos, obţinându-se *glicozide*. Ceilalţi hidroxili din moleculă nu reacţionează în aceste condiţii. Ei se pot metila cu iodură de metil, în prezenţa oxidului de argint, sau cu sulfat de metil, în prezenţa hidroxidului de sodiu. Grupele alcoolice metilate sunt foarte rezistente la hidroliză.

Grupele hidroxilice din monozaharide pot fi uşor *esterificate* cu anhidridă acetică (*acetilare*) în prezenţa bazelor. Esterii formaţi se pot hidroliza, regenerându-se monozaharidul iniţial, folosindu-se o soluţie de amoniac în alcool etilic sau metoxid de sodiu în cloroform, din cauza sensibilităţii monozaharidelor faţă de baze.

4.2.2. MONOZAHARIDE MAI IMPORTANTE

Dintre monozaharidele mai mult sau mai puţin importante, se menţionează: *triozele, tetrozele, pentozele, hexozele, heptozele.*

Triozele nu se găsesc în natură în stare liberă, dar esterii lor cu acidul fosforic sunt intermediari importanţi în transformările biochimice ale hidraţilor de carbon.

Din cele opt aldo-pentoze, numai patru se găsesc în natură [*D (+)-xiloza, D (–)–arabinoza, L(+)–arabinoza, D(–)–riboza]*, iar din cele patru ceto-pentoze, numai două se găsesc în natură (*D–ribuloza şi L–xiluloza*). D (+) – xiloza este răspândită în natură, fiind o componentă a gumelor vegetale, iar sub formă de *xilan*, se găseşte în lemn, ca o componentă a hemicelulozei, în paie, coceni de porumb, coji de seminţe de bumbac şi seminţe de floarea-soarelui. *(–)–arabinoza* se găseşte rar în natură, ca o componentă a unor glucide. *L(+)–arabinoza* este mult răspândită în vegetale sub forma unei polizaharide numite *araban*, precum şi ca o componentă a gumelor, mucilagiilor vegetale, a hemicelulozei, a unor glucide şi dizaharide. *D(–)–riboza*, alături de *dezoxi-D-riboză*, este o componentă a acizilor nucleici, legată glicozidic de anumiţi derivaţi ai pirimidinei şi purinei şi de acid fosforic. *D–ribuloza*, o ceto–pentoză, are un rol important în asimilaţia dioxidului de carbon şi în degradarea aerobă a hidraţilor de carbon. *L–xiluloza*, o cetopentoză a fost identificată în urina bolnavilor de pentozurie.

Scanned with OKEN Scanner

Aldo-hexozele cu cei patru atomi de carbon asimetrici ai lor, există sub forma a 16 izomeri optici, astăzi toţi cunoscuţi. Ceto–hexozele, cu trei atomi de carbon asimetrici, pot forma opt izomeri optici. Hexozele cele mai importante sunt: *D–glucoza, D–manoza, D–galactoza şi D–fructoza,* care sunt şi cele mai răspândite monozaharide.

D(+)-glucoza este cel mai important monozaharid, mai ales, pentru fiziologia animală şi vegetală. În stare liberă se găseşte în fructe, flori, miere de albine, se găseşte combinată cu ea însăşi sau cu alte monozaharide (maltoza, lactoza, zaharoza, celobioza), în polizaharidele cele mai importante, amidonul şi celuloza, precum şi în nenumărate glicozide. Din toate aceste combinaţii, D–glucoza se obţine prin hidroliză cu acizi sau enzime.

În regnul animal, D–glucoza se găseşte în sânge, în concentraţie de 0,1%. În concentraţie mai mică de această limită, duce la tulburări. În boala numită diabet, D–glucoza este în concentraţie mărită în sânge şi în urină.

D–glucoza se prepară industrial din amidon, prin hidroliză cu acid clorhidric diluat în autoclavă la 2 atm. D–glucoza cristalizată din apă este de forma α. Prin recristalizare, din soluţie diluată de acid acetic, se obţine β–glucoza cristalizată. Aceasta nu este stabilă, deoarece urmele de apă o transformă în α–glucoză.

D(+)–manoza nu se găseşte liberă în natură, ci în polizaharidele ei, *mananii.*

D(+)-galactoza nu se găseşte în natură în stare liberă decât rar, dar este frecvent întâlnită în dizaharide (*lactoză),* trizaharide (*rafinoză*), tetrazaharide (*stahioză*), polizaharide *(galactanii* şi *galactoarabanii* din gume, cum este guma arabică), glicozide (*galactozide*) şi în fosfatidele din creier (*sfingomieline*). D– galactoza se obţine alături de D–glucoză, prin hidroliza lactozei.

D(–)–fructoza, o cetoză mult răspândită în vegetale, în stare liberă sau combinată, în zaharide (*zaharoză*), trizaharide (*gentianoză*), tetrazaharide (*stahioză*) şi polizaharide (*fructozani, levani*). Se prepară prin hidroliza unei polizaharide.

4.3. OLIGOZAHARIDE

Oligozaharidele sunt compuse din 2 – 10 resturi de monozaharide, iar polizaharidele sunt formate din mai multe monozaharide şi au structură macromoleculară. Cele mai importante sunt *dizaharidele*, care rezultă din unirea a două molecule de monozaharide, printr-o legătură glicozidică şi eliminarea

Scanned with OKEN Scanner

unei molecule de apă. Legarea resturilor de monozaharide în oligozaharide se face prin hidroxilul glicozidic al uneia dintre ele:

$$2\,C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$$

Trizaharidele provin din trei molecule de monozaharide, prin eliminarea a două molecule de apă.

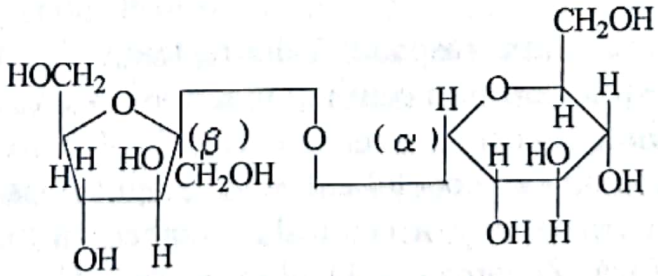
Prin hidroliză catalitică cu acizi sau enzime, oligozaharidele se descompun în monozaharide, care pot fi identice, ca în cazul dizaharidelor maltoza şi celobioza şi din care rezultă D–glucoză sau diferite, ca în cazul zaharozei şi lactozei, care dau câte o moleculă de D–glucoză şi o moleculă de D–fructoză şi, respectiv, o moleculă de D–glucoză şi o moleculă de D–galactoză.

Într-o dizaharidă, hidroxilul glicozidic al unuia din resturile de monozaharidă poate fi esterificat cu hidroxilul glicozidic sau cu un hidroxil alcoolic al celuilalt rest. Primul tip de legătură, denumită *dicarbonilică*, se întâlneşte în trehaloză şi în zaharoză, iar cel de al doilea tip, legătură *monocarbonilică*, se găseşte la maltoză, celobioză, lactoză etc. (1)

Dizaharidele cu legătură monocarbonilică conţin în moleculă un hidroxil glicozidic liber, ca şi în monozaharide. Aceste dizaharide dau reacţiile tipice monozaharidelor: apar în forma a doi anomeri $\alpha \leftrightarrow \beta$, reduc soluţia Fehling, trec prin oxidare într-un acid carboxilic, dau naştere la oxime, hidrazone, oxazone etc. Aceste dizaharide se numesc *reducătoare*. Dizaharidele cu legătură dicarbonilică, care au ambii hidroxili glicozidici blocaţi, nu pot da reacţiile menţionate mai sus şi se numesc *nereducătoare*.

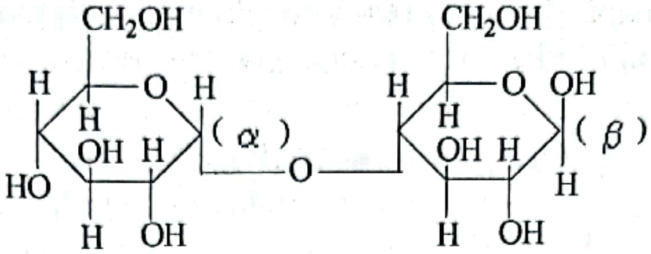
Dintre dizaharide, se menţionează: *zaharoza, maltoza, celobioza, lactoza.*

Zaharoza nu este reducătoare, prin hidroliză, trece într-o moleculă de D–glucoză şi o moleculă de D–fructoză. Ca în toate oligo- şi polizaharidele, D–fructoza este combinată în formă furanozică.



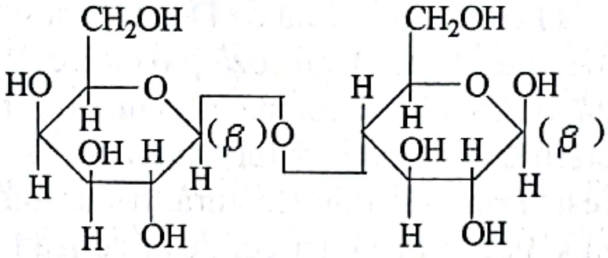
[O–β–D–fructofuranozil– (2→1)–α - D–glucopiranozid]

Zaharoză



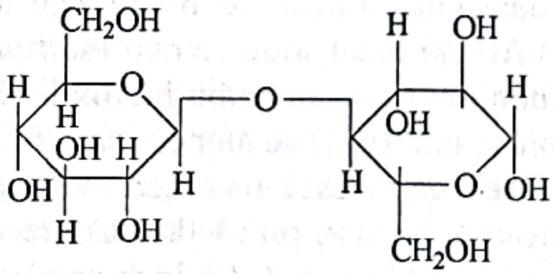
[O– α –D–glucopiranozil–(1 ➝ 4)– β –D–glucopiranozã]

Maltozã (forma β)



Lactozã (forma β)

[O– β –D–galactopiranozil–(1➝ 4)– β –D–glucopiranozã]



Celobiozã (forma β)

Zaharoza este cea mai răspândită dintre toate oligozaharidele; ea se găseşte în mai toate plantele şi în cantităţi mai mari este în flori, în sfecla de zahăr, trestia de zahăr, în cocenii tineri de porumb. Zaharoza este uşor solubilă în apă şi greu solubilă în alcoolul etilic. În soluţie apoasă, este dextrogiră. Sub influenţa acizilor, chiar şi a celor slabi, zaharoza hidrolizează la D–glucoză şi D–fructoză. Zaharoza şi D–glucoza sunt slab dextrogire şi D–fructoza puternic levogiră, ceea ce face ca soluţia să devină levogiră după hidroliză, de unde şi numele de *inversie*, care se dă acestei hidrolize şi acela de *zahăr invertit*, atribuit amestecului celor două monozaharide.

Scanned with OKEN Scanner

Maltoza, ca şi *celobioza* şi *lactoza* sunt dizaharide reducătoare.

Maltoza este o dizaharidă compusă din două molecule de D–glucoză, are formula unei D–glucopiranozido–4–D–glucopiranoze, posedă un hidroxil glicozidic liber şi de aceea poate exista în două forme anomere ($\alpha \leftrightarrow \beta$).

Maltoza se găseşte în multe plante în cantităţi mici. Se obţine industrial prin hidroliza enzimatică a amidonului şi serveşte ca intermediar la fabricarea berii şi a alcoolului etilic. *α–Glicozidaza* sau *maltaza* este enzima care scindează maltoza la glucoză. Ea se găseşte în drojdia de bere, în salivă, în sucul pancreatic şi în cel intestinal.

Lactoza este o dizaharidă reducătoare care se găseşte numai în lapte, în proporţie de 4 – 6 % şi se izolează prin concentrarea zerului. Prin hidroliză cu acizi duce la D–glucoză şi D–galactoză, în părţi egale. Prin oxidarea lactozei, se formează *acidul lactobionic*, care trece prin hidroliză în *galactoză* şi *acid gluconic*.

Celobioza se găseşte în celuloză, de unde poate fi obţinută. Este un dizaharid reducător, care, prin hidroliză, trece în două molecule de D–glucoză de formă piranozică, ca şi în maltoză. Deosebirea între celobioză şi maltoză constă în natura legăturii glicozidice la atomul C1. Aceasta are în maltoză configuraţia α, iar în celobioză β, aşa cum se vede din formulele de mai sus.

Celobioza nu este fermentată de drojdie. β–Glicozidaza din emulsină scindează celobioza în două molecule de glucoză. Animalele superioare nu posedă o enzimă care să hidrolizeze celobioza, motiv pentru care nu poate fi folosită în alimentaţia lor.

4.4. POLIZAHARIDE

Polizaharidele sunt compuşi macromoleculari mult răspândiţi în natură şi mai ales în vegetale. Prin hidroliză, acidă sau enzimatică, polizaharidele se transformă în monozaharide sau derivaţi monozaharidici simpli. În natură, se găsesc polizaharide compuse din hexoze, pentoze şi derivaţi ai hexozelor. Unitatea monozaharidică predominantă a polizaharidelor este D–glucoza. Cele mai însemnate polizaharide care au la bază D–glucoza sunt celuloza şi amidonul. Celuloza, dintre toate substanţele organice de pe globul pământesc, se găseşte în cea mai mare cantitate.

În natură, se întâlnesc polizaharide compuse din hexozele: D–manoză (*mananii*), D–galactoză (*galactanii*), D–fructoză (*fructozanii*); din pentozele: D– xiloză (*xilozanii*), D–arabinoză (*arabanii*). *Pectinele* conţin o polizaharidă constituită din acid galacturonic. Derivaţii monozaharidici care formează

Scanned with OKEN Scanner

unităţile structurale ale polizaharidelor naturale sunt: *D–glucozamina, D–galactozamina, acidul D–glucuronic, acidul N-acetil-muramic* şi *acidul N-acetil-neuraminic*. Mult răspândite în natură sunt şi polizaharidele compuse din două sau mai multe monozaharide diferite.

Polizaharidele numite *glicani* se deosebesc în ceea ce priveşte repetitivitatea unităţilor monozaharidice, lungimea lanţului şi gradul de ramificare. Ele se clasifică în *homopolizaharide*, care conţin un singur tip de monomer (de exemplu, *amidonul* şi *glicogenul* care conţin monomerul D–glucoza) şi *heteropolizaharide*, care conţin două sau mai multe tipuri de monomeri (de exemplu, acidul hialuronic care conţine alternativ resturi de acid D–glucuronic şi N-acetil-D-glucozamină).

Polizaharidele, după funcţiile ce le îndeplinesc în plante sau animale, se pot divide în *polizaharide de rezervă* şi *polizaharide de structură*.

4.4.1. POLIZAHARIDE DE REZERVĂ

Polizaharidele de rezervă, dintre care, *amidonul* este cel mai răspândit în plante şi *glicogenul* în animale, sunt obişnuit depozitate sub forma unor granule mari în citoplasma celulară. Când se produce un surplus de D–glucoză, acesta este depozitat prin legare enzimatică la capetele lanţului de glicogen sau de amidon, iar pentru necesităţile metabolice, este eliberat enzimatic pentru a fi utilizat ca sursă de energie. În rândul polizaharidelor de rezervă, se menţionează, de asemenea, *dextranii, fructanii, mananii* şi *inulina*.

Amidonul este cea de-a doua polizaharidă, după celuloză, în funcţie de cantitatea şi gradul de răspândire în plante de pe globul pământesc. Ca şi celuloza, amidonul este constituit din D–glucoză. Plantele îşi constituie rezerva de amidon în seminţe, fructe şi tuberculi. Amidonul este insolubil în apă, dar poate fi uşor transformat în D–glucoză sau în derivaţii acesteia prin reacţii enzimatice. În plante, amidonul se prezintă sub formă de granule de formă şi mărime specifice diferitelor specii vegetale. Diametrul granulelor este de 20 – 100 μ.

Amidonul este insolubil în apă rece şi solubil la temperaturi apropiate de 100°C, în funcţie de proveniență, formându-se o soluţie vâscoasă, care, la 57 – 87°C, se transformă într-un gel omogen.

Amidonul este un amestec de două polizaharide: *amiloza* şi *amilopectina*. Separarea amilozei de amilopectină se poate realiza punând amidonul în apă la temperatura de 70°C, când granulele de amidon se umflă, fără să se spargă, iar amiloza se dizolvă şi trece în soluţie. O metodă mai eficientă

Scanned with OKEN Scanner

constă în dizolvarea totală a amidonului în apă fierbinte şi apoi adăugarea unui agent de precipitare a amilozei (n-butanol, n-pentanol, ciclohexanol, timol, acizi graşi, nitroalcani). Agentul de precipitare se separă, apoi, cu ajutorul dizolvanţilor. Amidonul conţine aproximativ 20% amiloză şi restul este amilopectină.

Formula brută a amidonului determinată prin analiza elementară este $(C_6H_{10}O_5)_n$, la fel ca şi a celulozei. Amidonul, ca şi celuloza sunt constituite din resturi de D–glucopiranoză, unite în poziţiile 1, 4 prin legături α – glicozidice la amidon şi β – glicozidice la celuloză. Structura amidonului este dată în fig. 4.6.

Amilopectina are o masă moleculară de 1 000 000 – 6 000 000. Macromoleculele de amilopectină sunt ramificate, fiind compuse din lanţuri de câte 18–26 resturi de glucoză legate între ele prin grupele lor aldehidice (fig. 4.6a.).

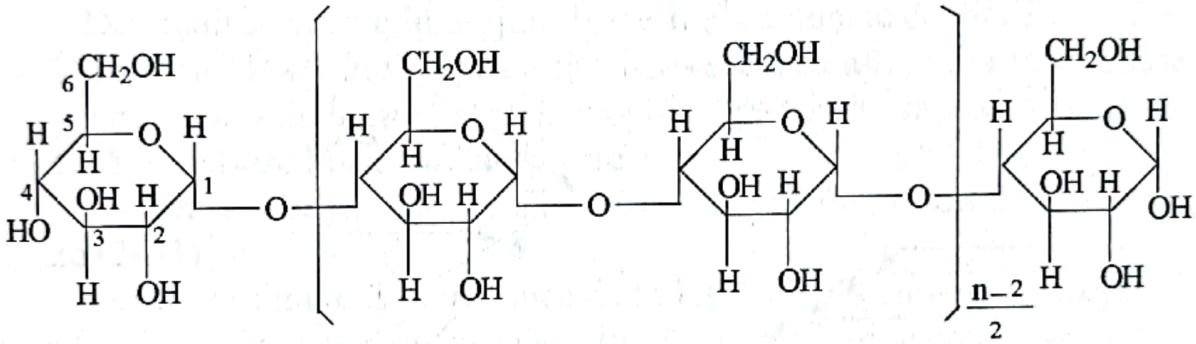


Fig. 4.6. Macromolecula de amidon

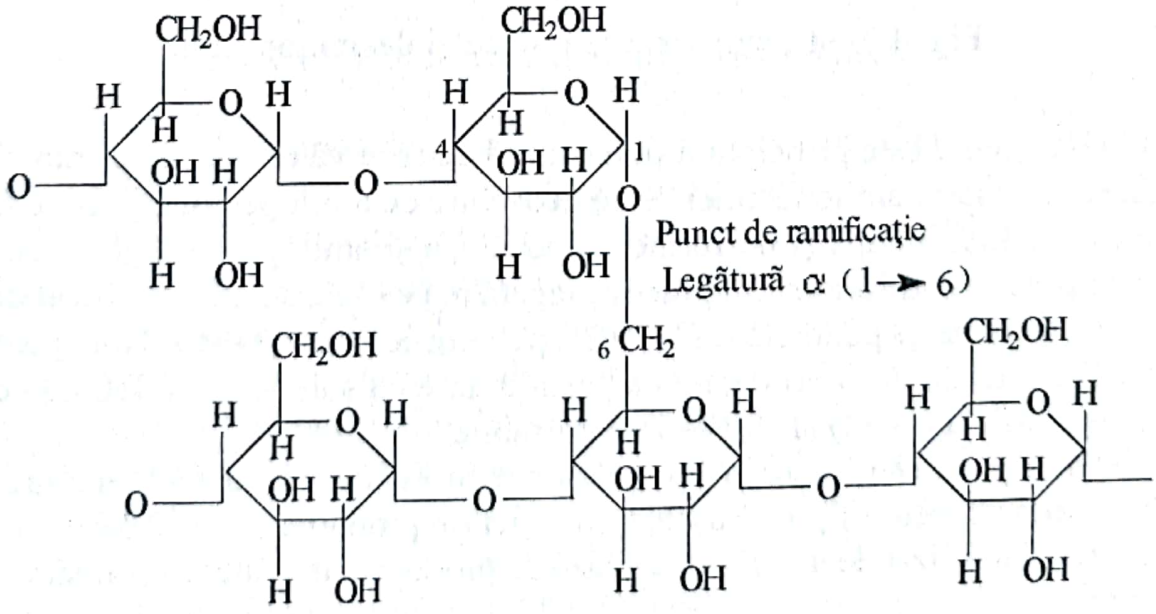


Fig. 4.6a. Fragment dintr-o macromoleculă de amilopectină

Pentru reprezentarea structurii macromoleculei de amilopectină, s-au propus trei tipuri de scheme (fig. 4.7.), în care liniile drepte reprezintă catenele de 18 – 26 de resturi de glucoză legate între ele prin legături 1, 4 – α – glicozidice, iar săgeţile reprezintă legături 1,6 – α – glicozidice. Fiecare macromoleculă are multe grupe marginale nereducătoare şi o singură grupă reducătoare R (1).

Amiloza are greutatea moleculară de 90 000 – 200 000. Macromoleculele mai scurte de amiloză, au legături numai 1,4 – α – glicozidice, sunt compuse din catene perfect liniare, iar amilozele cu grade mai mari de polimerizare conţin o proporţie mică de legături 1,3 – α – glicozidice.

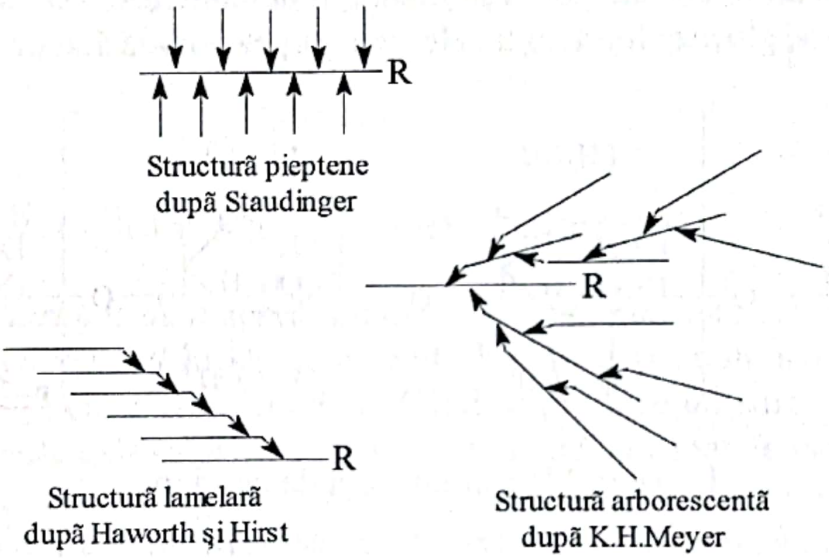


Fig. 4.7. Structura macromoleculei de amilopectină

Glicogenul este principalul polizaharid de rezervă din celulele animale şi este asemănător amilopectinei. Spre deosebire de amilopectină, glicogenul este uşor solubil în apă şi nu formează cocă. Ca şi amilopectina, glicogenul este un polizaharid format din glucoză legată α(1↔4), este mai ramificat decât amilopectina şi punctele de ramificaţie sunt legate α(1↔6). Glicogenul poate fi extras din ţesuturile animale, prin tratare cu soluţie de KOH, faţă de care legăturile α (1↔4) şi α (1↔6) sunt stabile.

Glicogenul se găseşte în cantitate mare în ficat (până la 10 % din greutatea umedă a ficatului) şi în muşchii scheletici (în proporţie de 1 – 2 %). Glicogenul este hidrolizat de α – şi β – amilaze cu producere de glucoză şi maltoză.

Scanned with OKEN Scanner

Dextranul este un polizaharid format din D–glucoză, dar, spre deosebire de glicogen şi amidon, are ca legătură de bază 1,6 – α – glicozidică (fig. 4.7a.).

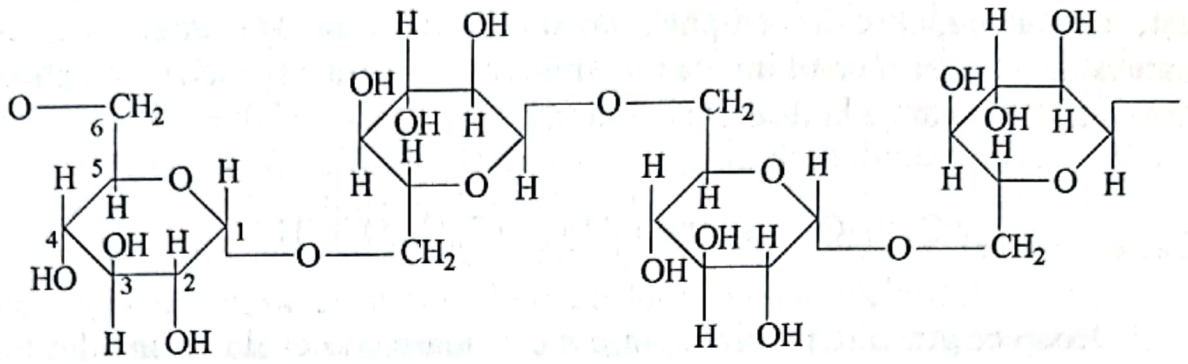


Fig. 4.7a. Legătura de bază a dextranului

Dextranii se găsesc în drojdii, bacterii şi au puncte de ramificaţie 1↔2, 1↔3, 1↔4 sau 1↔6, în funcţie de specie. Formează soluţii foarte vâscoase.

Fructanii sau *levanii* sunt homopolizaharide ce se compun din D–fructoză. Se găsesc în numeroase plante.

Inulina se găseşte în anghinare şi este formată din resturi de D–fructoză legate (2↔1).

Mananii sunt prezenţi din nuca de fildeş, lemnul coniferelor, coaja dură a multor sâmburi (coacăze, curmal), drojdii, bacterii, ciuperci şi se compun din resturi de manopiranoză legate prin legături β – 1, 4, ca şi în celuloză.

4.4.2. POLIZAHARIDE DE STRUCTURĂ

Multe polizaharide servesc, mai ales, ca elemente de structură ale pereţilor celulari, a învelişurilor celulare, ale spaţiului intracelular, cărora le conferă forma, elasticitatea sau rigiditatea ţesuturilor vegetale. Astfel, cel mai important polizaharid de structură, din punct de vedere cantitativ şi grad de răspândire, este *celuloza*. Unele polizaharide sunt componente majore ale formaţiilor scheletice exterioare ale unor nevertebrate, aşa cum este *chitina*.

Celuloza este materialul din care sunt construiţi pereţii celulelor vegetale şi, adesea, se găseşte în plante sub formă de fibre. În plante, celuloza este frecvent amestecată cu cantităţi variabile de alte polizaharide, lignină, grăsimi, răşini şi substanţe minerale. Îndepărtarea acestor substanţe străine nu este posibilă fără modificarea, mai mult sau mai puţin pronunţată, a celulozei. Celuloza cea mai pură se găseşte în fibrele vegetale textile (perii semniţelor de bumbac, fibrele din tulpina de ramie, fibrele de in).

Scanned with OKEN Scanner

Celuloza, prin tratare cu acid clorhidric suprasaturat, se desface aproape cantitativ în D–glucoză. Celuloza este un compus macromolecular, nu se topeşte la încălzire, ci se descompune, iar soluţiile sale au caracter coloidal. Se poate admite că, prin combinarea mai multor molecule de glucoză, cu eliminare de apă, se ajunge la formula celulozei:

$$n C_6H_{12}O_6 \longrightarrow (n-1)H_2O + (C_6H_{10}O_5)_n H_2O$$

Deoarece gradul de polimerizare *n* este mare, molecula de apă din formula de mai sus nu poate fi decelată prin analiza elementară, aşa că formula este destul de exact redată prin: $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Toate resturile de glucoză din macromolecula de celuloză sunt unite între ele în poziţiile C1 şi C 4, prin legături β – glicozidice (fig. 4.8.).

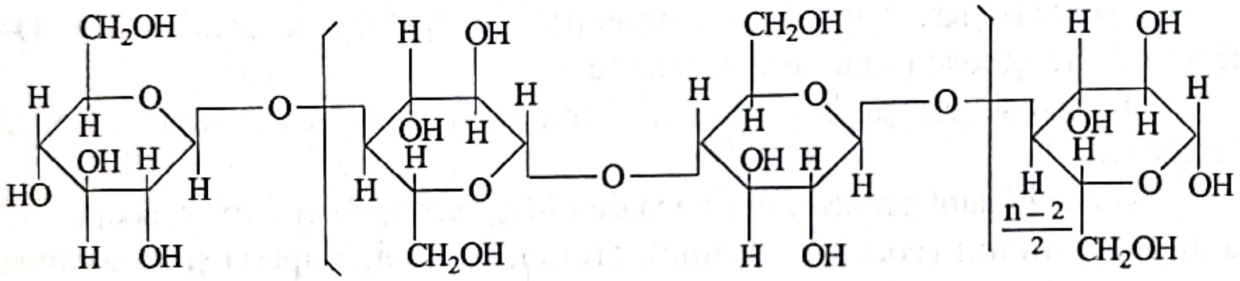


Fig. 4.8. Macromolecula de celuloză

Macromoleculele de celuloză de diferite proveniențe au o masă moleculară dată de diferite surse, de la 50 000 la 2 500 000, iar gradul de polimerizare de 300 la 15 000. Celulozele cu grade de polimerizare diferite se deosebesc prin anumite proprietăți fizice (rezistența mecanică, îmbibarea cu dizolvanți şi solubilitatea).

Celuloza este formată din mănunchiuri de lanțuri paralele formând fibre. Celuloza nu are punct de topire. Încălzită la presiune redusă, în anumite condiţii, suferă o depolimerizare, trecând în glucozan.

Celuloza este complet insolubilă în apă, insolubilitate determinată de numărul mare de legături de hidrogen dintre macromolecule. În apă, are loc doar o îmbibare limitată sau o umflare în cursul căreia moleculele de apă înconjoară macromoleculele de celuloză, dar ele nu trec în soluție.

Fibrele de celuloză păstrate în aer de umiditate normală, absorb 7 – 8 % apă, în aerul saturat cu vapori de apă absorb 22 – 24 % apă. Celuloza este,

Scanned with OKEN Scanner

deci, higroscopică. La îmbibarea cu apă, fibrele de celuloză cresc puțin în diametru, iar lungimea lor rămâne neschimbată.

Soluțiile de hidroxid de sodiu produc o îmbibare a celulozei mult mai puternică decât în apă. Cu o soluție concentrată de hidroxid de sodiu, se produce *alcalicelluloza*, iar celuloza sodată are compoziția de un mol de celuloză la un mol de NaOH. Cu apă în exces, celuloza sodată suferă hidroliză, regenerând celuloza. Celulozele degradate, cu grad de polimerizare sub 300 se dizolvă, la rece, în soluție de 2,5 N NaOH.

Oxicelulozele sunt cele care au suferit alterări prin oxidare, mai ales în prezența bazelor, de exemplu, albirea celulozei cu hipocloriți.

Celuloza nu este atacată de α – sau β – amilaze. Enzima care hidrolizează celuloza este *celulaza*. Aceasta nu se găsește în sucul digestiv al majorității mamiferelor și, de aceea, ele nu pot utiliza celuloza ca sursă de hrană. Rumegătoarele fac excepție, deoarece bacteriile din rumenul lor secretă celulază, care hidrolizează celuloza la D–glucoză.

Chitina are structură polizaharidică și este o componentă importantă a formațiilor scheletice exterioare ale unor nevertebrate (insecte, crustacee, viermi, moluște).

Chitina este un polizaharid care conține azot, deoarece este un homopolimer format din N–acetil–D–glucozamină, legată β (1→ 4). Structura sa este asemănătoare cu a celulozei de care se deosebește prin faptul că grupa OH din poziția 2 a celulozei este înlocuită cu restul $NHCOCH_3$. Această structură explică marea rezistență mecanică a chitinei (fig. 4.9.).

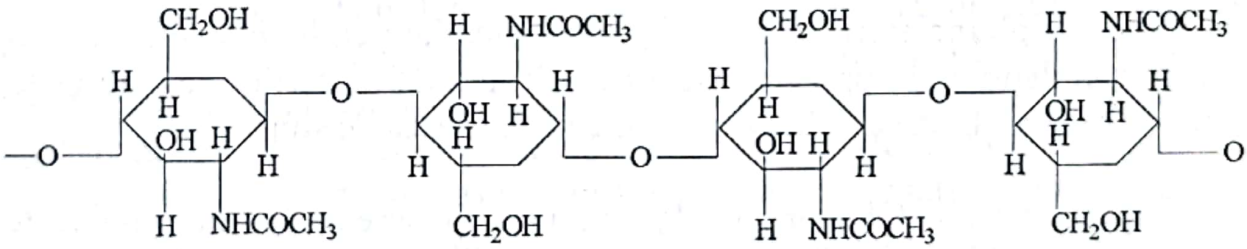


Fig. 4.9. Macromolecula de chitină

Prin hidroliză cu *chitinază*, enzimă din tubul digestiv al melcului, se formează N–actil–glucozamină. La 6–7 resturi de N–acetil–D–glucozamină, se găsește un rest neacilat. Chitina fiind un poliacetal, este cu ușurință hidrolizată de acizi, dar este stabilă la acțiunea soluțiilor alcaline diluate. La temperaturi de 50 – 60°C, chitina se denaturează în timp, iar în mediu puternic alcalin, este oxidată de oxigenul din aer.

Scanned with OKEN Scanner

Chitina este un compus macromolecular filmogen, la fel ca şi derivaţii săi. Poate forma amestecuri omogene cu alţi polimeri naturali şi sintetici. Ca şi celuloza, este deosebit de reactivă.

În mediu de hidroxid de sodiu, formează alcalichitina:

$$\underset{\text{Chitina}}{C_6H_7O_2(OH)_2(NHCOCH_3)} + NaOH \longrightarrow \underset{\text{Alcalichitina}}{C_6H_7O_2(OH)(NHCOCH_3)ONa} + H_2O$$

Chitina se poate acetila cu anhidrida acetică, clorura de acetil şi cu acidul acetic:

$$C_6H_7O_2(OH)_2(NHCOCH_3) + {}_2(CH_3CO)_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow C_6H_7O_2(NHCOCH_3)(OCOCH_3)_2 + {}_2CH_3COOH$$

$$C_6H_7O_2(OH)_2(NHCOCH_3) + 2ClCOCH_3 \rightarrow$$
$$C_6H_7O_2(NHCOCH_3)(OCOCH_3)_2 + HCl$$

Alcalichitina cu sulfura de carbon trece în xantogenat de chitină:

$$\underset{\text{Alcalichitina}}{C_6H_7O_2(OH)(NHCOCH_3)ONa} + CS_2 \longrightarrow \underset{\text{Xantogenat de chitină}}{R(OH)(NHCOCH_3)O-CS_2Na}$$

Se pot obţine eteri de chitină prin O–alchilare cu halogenuri alchilice sau cu alchilsulfaţi, în prezenţa alcaliilor. Proprietăţile eterilor de chitină depind de radicalul introdus la O–alchilare şi de gradul de substituţie.

Glicoproteine. Glicoproteinele sunt un grup mare de proteine conjugate, cu importanţă biologică deosebită, care conţin resturi de hidraţi de carbon legate covalent de lanţuri polipeptidice, cum sunt unii hormoni (*gonadotropina corionică, hormonul stimulator al foliculinei, hormonul stimulator al tiroidei),* unele enzime (*pepsina, β–glucuronidaza, ribonucleaza B*), *ovalbumina, avidina* şi *ovomucoidul din albuşul de ou, glicoproteinele învelişului celular, glicoproteinele din sânge, mucoproteinele din secreţiile mucoaselor, glicoproteinele din membranele fundamentale extracelulare.*

Scanned with OKEN Scanner

4.5. GLICOPROTEIDE

Glicoproteidele conţin resturi de hidraţi de carbon legate covalent de lanţul polipeptidic şi reprezintă un grup mare de compuşi cu o deosebită semnificaţie biologică. Dintre glicoproteidele mai importante prezente în celule şi, mai ales, extracelular, se menţionează: în membranele celulare (*glicoforina eritrocitelor membranare*), în membranele extracelulare (*glicoproteida din membrana bazală*), în *colagen*, în plasmă (*imunoglobuline, fibrinogen, acidul α_1–glicoproteic, fetuina, proteinele de grup sanguin*), în secreţii ale mucoaselor (*glicoproteidele gastrice, glicoproteidele submaxilare*), în albuşul de ou (*ovalbumina, ovomucoida, avidina*), unele enzime (*pepsina, β–glucuro-nidaza, ribonucleaza B*), unii hormoni (*hormonul stimulator al foliculinei, hormonul stimulator al tiroidei, gonadotropina corionică*). Procentul cantitativ al hidraţilor de carbon în glicoproteide variază de la cel puţin 1% până la 80%. O cantitate însemnată de hidraţi de carbon se găseşte în glicoproteidele cunoscute sub numele de *mucoproteide* sau *mucoide* sau *mucine*. Glicoproteidele cu un conţinut ridicat de hidraţi de carbon poartă numele de *proteoglicani.*

Mucoproteidele se împart în solubile, insolubile şi acide. Dintre mucoidele solubile, se menţionează: *mucoida din salivă,* din *ou* (*ovomucoida*), din *bacilul antrax* şi *gonadotropina corionică*. Dintre mucoidele insolubile, fac parte: *ovomucoida β,* proteida reziduală din umoarea sticloasă şi capsula cristalinului şi *o mucoidă acidă* care este secretată de glanda submaxilară.

Hidraţii de carbon din glicoproteide sunt polizaharide care conţin întotdeauna resturi de N–acetil–hexozamină, alături de resturile altor monozaharide sau acizi uronici (1). Mucoproteidele sunt substanţe gelatinoase; unele contribuie la lubrefiere, altele au rol de ciment flexibil intracelular.

La mucoproteide, partea proteică ocupă, în majoritatea cazurilor, o poziţie centrală, de tipul unui miez al macromoleculei, iar polizaharidele se găsesc la exterior, ca lanţuri laterale lungi (fig. 4. 10.).

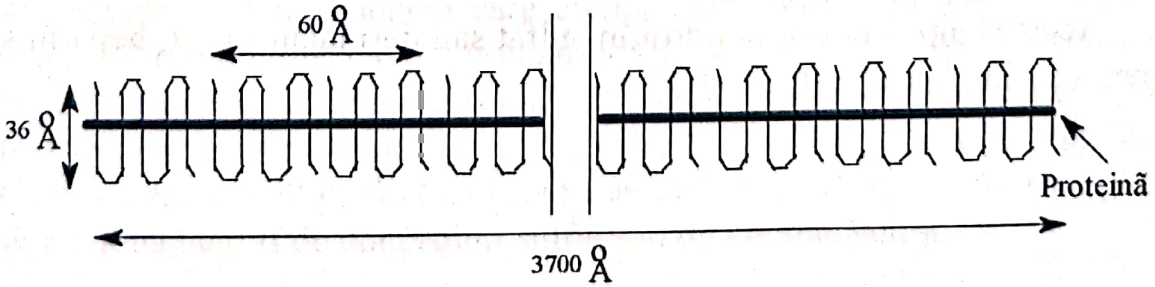
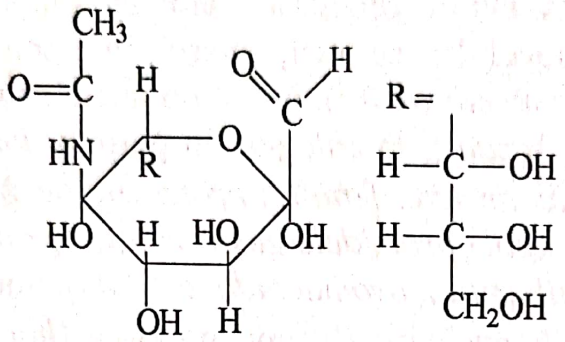


Fig. 4. 10. Reprezentarea schematică
a complexului proteină–mucopolizaharidă

Scanned with OKEN Scanner

Lanţurile laterale, liniare sau ramificate, pot conţine de la două până la zeci de resturi monozaharidice. Cel mai adesea, monozaharidul terminal este un rest încărcat negativ al *acidului N–acetil neuraminic* (acidul sialic).



Acid N–acetilneuraminic
(acid sialic)

Majoritatea mucopolizaharidelor din organism sunt legate de proteine formând *proteoglicani.*

Proteoglicanii sunt o clasă aparte de glicoproteine care au fost glicozilate. Ei constau, aşa cum s-a precizat mai sus, dintr-un miez proteic şi unul sau mai multe lanţuri de glicozaminoglicani care sunt ataşate covalent. Glicozamino-glicanii au lanţuri lungi, polimeri carbohidraţi liniari, care sunt încărcaţi negativ sub condiţiile fiziologice (4.11.).

Un proteoglican este o combinaţie a unei proteine şi a unui glicozaminoglican. Asocierea între cele două tipuri de lanţuri se efectuează în aparatul Golgi, dar, în mod egal, la nivelul reticulului endoplasmatic al unei celule. Proporţia glucidelor proteoglicanilor poate ajunge la 95 %. Aceasta se prezintă sub forma unuia sau mai multor lanţuri de glicozaminoglicani neramificaţi.

Proteoglicanii se pot clasifica în funcţie de natura lanţurilor de glicozaminoglicanii pe care îi conţin.

Aceste lanţuri pot fi: condroitin sulfat sau dermatan sulfat; heparin sau heparan sulfat; keratan sulfat etc.

Scanned with OKEN Scanner

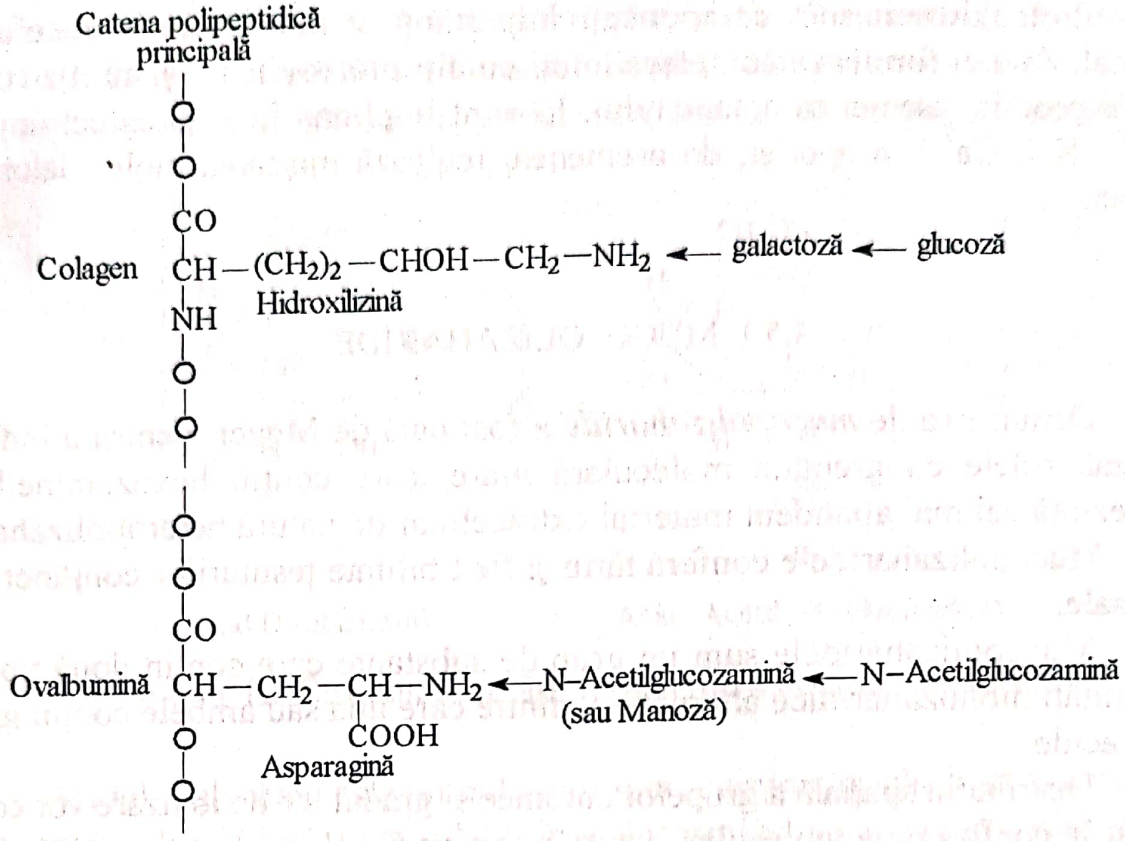


Fig. 4.11. Catene laterale oligozaharidice ale glicoproteidelor colagen şi ovalbumină

Proteoglicanii pot fi, de asemenea, grupaţi după mărimea lor:

– Proteoglicani mari, cum sunt: *aggrecan*, principalul proteoglican din cartilaj şi *versican* prezent în multe ţesuturi adulte care includ vasele de sânge şi pielea. Aggregan este glicozilat cu condroitin sulfat. Versican este, de asemenea, glicozilat cu condroitin sulfat şi face parte din aceeaşi familie de proteoglicani cu *Aggreca, Neuroca, Lectican*.

– Proteoglicani mici bogaţi în leucină, cum sunt: *fibromodulin, lumican, decorin* şi *biglican*. Fiecare din aceşti proteoglicani au câte 10–12 leucine, tandem care se repetă şi care completează porţiunea centrală, miezul proteic. Fibromodulin, ca şi lumican conţin sulfatul de keratan. Fibromodulin se găseşte de-a lungul fibrelor cartilajului articular, împreună cu multe ţesuturi conjunctive. Decorin este glicozilat, cu un singur lanţ de condroitin sulfat sau keratan sulfat. Biglican este asemănător cu decorin, dar este glicozilat cu două lanţuri de condroitin sulfat sau de keratan sulfat.

Scanned with OKEN Scanner

Proteoglicanii sunt componenţi importanţi ai matrixului extracelular animal. Aici ei formează complecşi mari cu alţi proteoglicani şi cu matrixul fibros proteic, asemenea colagenului. Ei sunt implicaţi în legarea cationilor (Na^+, K^+, Ca^{2+}), a apei şi, de asemenea, reglează mişcarea moleculelor în matrix.

4.5.1. MUCOPOLIZAHARIDE

Denumirea de *mucopolizaharide* a fost dată de Meyer, pentru a indica polizaharidele cu greutate moleculară mare, care conţin hexozamine.Ele reprezintă cel mai abundent material extracelular de natură heteropolizaharidică. Mucopolizaharidele conferă tărie şi flexibilitate ţesuturilor conjunctive animale.

Mucopolizaharidele sunt un grup de substanţe care conţin două tipuri de unităţi monozaharidice alternative, dintre care una sau ambele conţin grupări acide.

Distribuţia spaţială a grupelor anionice şi gradul lor de ionizare vor contribui la conformaţia moleculei, datorită respingerii electrostatice reciproce a sarcinilor negative de-a lungul catenei principale polizaharidice. În plus, atât conformaţia unei molecule simple, cât şi structura terţiară a mucopolizaharidelor în soluţii concentrate, geluri şi în stare solidă, vor fi influenţate de numărul mare de legături de hidrogen inter- şi intramoleculare dintre grupele polare abundente şi de interacţiunile hidrofobe ale părţii proteice.

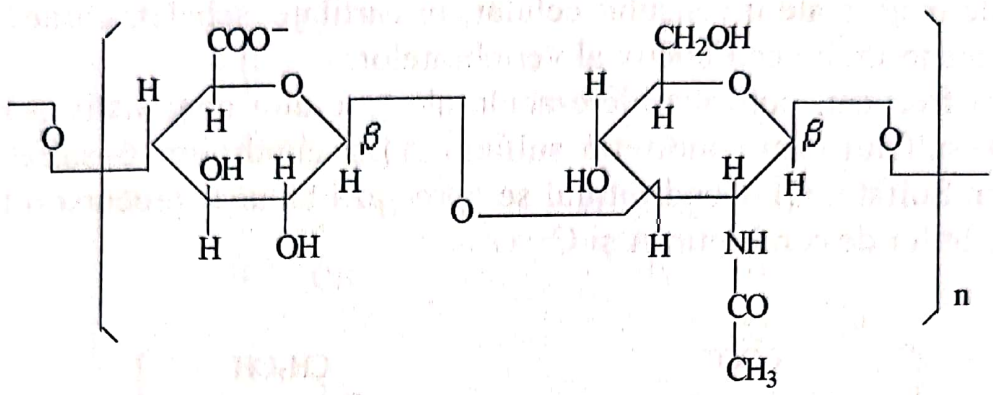
Mucopolizaharidele cele mai importante cantitativ şi fiziologic sunt: *acidul hialuronic, condroitin 4 şi 6 sulfaţii, heparina, sulfatul de heparină, sulfatul de dermatan* şi *sulfatul de keratan.*

4.5.1.1. ACIDUL HIALURONIC

Acidul hialuronic este unul dintre cele mai importante mucopolizaharide ale ţesutului conjunctiv. El a fost izolat pentru prima dată de Meyer şi Palmer din umoarea vitroasă din ochiul de vită. Este foarte răspândit în diferite ţesuturi conjunctive. Este prezent în învelişul celular, în lichidele sinovial şi vitros ale animalelor şi în unele bacterii. Meyer a demonstrat că acidul hialuronic este format din cantităţi echimoleculare de acid glucuronic şi 2–acetamido–2–deoxi–D–glucoză (fig. 4. 12.).

Prin repetarea unităţii dizaharidice, ia naştere lanţul polimeric al acidului hialuronic, în care partea de glucozamină este legată prin legătură

β–glicozidică în poziţia C-3 a acidului glucuronic [2–acetamido–2–deoxi–3–O– (β–D–glucopiranozil acid uronic)–D–glucoză]. Polimerul se realizează prin legătura 1→ 4–β–glicozidică a grupei care se repetă a acidului hialuronic.



Acid D–glucuronic Acid Acetil–D–glucozamină

Fig. 4.12. Structura unităţii repetabile a acidului hialuronic

Acidul hialuronic este un polimer liniar, conţine grupări carboxil complet ionizate la pH = 7. Este solubil în apă, formând soluţii foarte vâscoase. Unitatea repetabilă a acidului hialuronic este un segment de lanţ foarte rigid, cu o lungime de 11,98Å.

Gradul de polimerizare a acidului hialuronic variază după tipul de ţesut conjunctiv în care se găseşte şi condiţiile fiziologice locale. Greutatea sa moleculară este de 2 – 5 x 10^5 în umoarea vitroasă, de 1–10 x 10^6 în cordonul ombilical, de 3,5 – 6 x 10^4 în peretele aortei. Acidul hialuronic cu greutate moleculară mică are molecula sub formă de bastonaş, cu o lungime de 250 – 1000Å. Moleculele mai mari au formă de spirală dezordonată, cu raza de giraţie de 540 – 4540Å.

Enzima *hialuronidaza* catalizează hidroliza legăturii β(1→ 4) a acidului hialuronic. Acidul hialuronic poate asocia şi transfera o mare cantitate de apă.

4.5.1.2. CONDROITINA, CONDROITIN – 4 – SULFAT, CONDROITIN– 6 – SULFAT

Condroitin mucopolizaharida este strâns înrudită cu acidul hialuronic sub aspect structural. Se aseamănă cu acidul hialuronic la structura primară, cu excepţia că fragmentul hexozamina este o galactozamină, în loc de glucozamină. Această mucopolizaharidă a fost izolată de Meyer din corneea bovină

şi este un polimer (1→ 4)–O–β–D acid glucopiranoziluronic–(1→ 3)–2–aceta-mido–2–deoxi–β–D – galactopiranoză.

Condroitina este un component minor al materialului extracelular, în schimb, condroitin–4–sulfatul şi condroitin–6–sulfatul sunt componente structurale majore ale învelişului celular, în cartilaje, schelet, cornee şi alte structuri ale ţesutului conjunctiv al vertebratelor.

Mai frecvent, polizaharidele acide ale ţesutului conjunctiv sunt condroitin–4–sulfatul (sau condroitin sulfatul A) şi condroitin–6–sulfatul (sau condroitin Sulfatul C). Condroitinul se apreciază că ar fi precursorul biologic al sulfaţilor de condroitin A şi C.

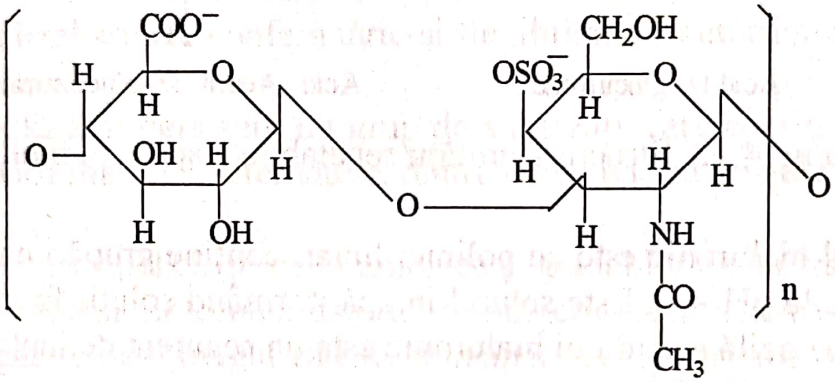


Fig. 4.13. Structura unităţii repetabile din condroitin – 4 – sulfatul

Condroitin–4–sulfatul (A) s-a izolat, pentru prima dată, din cartilaje. Unitatea repetabilă din lanţul polimerului este o dizaharidă, *condrozina*, în care acidul glucuronic este legat printr-o legătură 1→3–β de fragmentul galacto-zamină, iar galactozamina este sulfatată în poziţia C4 (fig. 4. 13.).

Condroitin–6–sulfatul (C) a fost izolat, pentru prima dată, de Meyer şi Palmer din cordonul ombilical. Singura diferenţă între condroitin–4–sulfatul şi condroitin–6–sulfatul este poziţia sulfatului de pe fragmentul galactozamină. În primul caz, el se găseşte în poziţia C4 şi în cel de-al doilea, în poziţia C6.

4.5.1.3. SULFATUL DE DERMATAN

Sulfatul de dermatan sau *sulfatul de condroitin B* sau *β–heparina* s-a izolat, pentru prima dată, din pielea de porc.

Unitatea repetabilă a sulfatului de dermatan este: (1→ 4)–O–α–L–acid idopiranoziluronic–(1→3)–2–acetamido–2–deoxi–4–O–sulfo–β–D–

galacto-piranoză (fig. 4.14.). Totuşi, sunt dovezi că sulfatul de dermatan este compus numai din resturi iduronice şi N–acetil–galactozaminice.

Sulfatul de dermatan se găseşte în piele, cornee şi ţesutul osos.

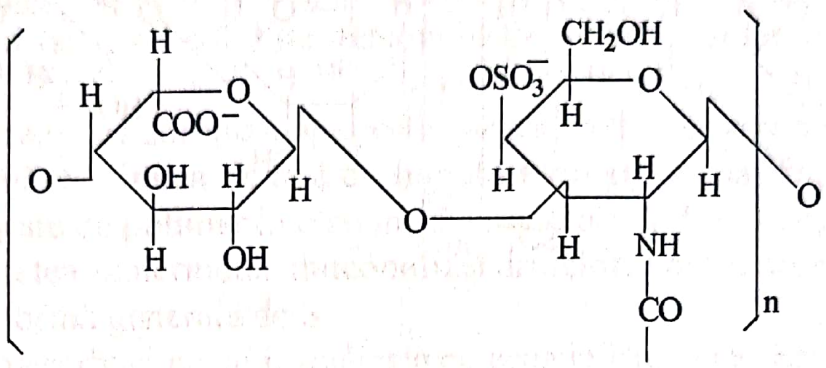


Fig. 4.14. Structura unităţii repetabile din sulfatul de dermatan

4.5.1.4. HEPARINA, SULFATUL DE HEPARINĂ

Heparina este o polizaharidă acidă, puternic sulfatată şi a fost izolată de McLean din ficat. Ea se găseşte, de asemenea, în piele, muşchi, plămâni, inimă, rinichi şi în sânge. Ea previne coagularea sângelui.

Unitatea repetabilă a heparinei este formată din cantităţi echimoleculare de resturi de D–glucozamină şi de acid D–glucuronic (fig. 4. 15.).

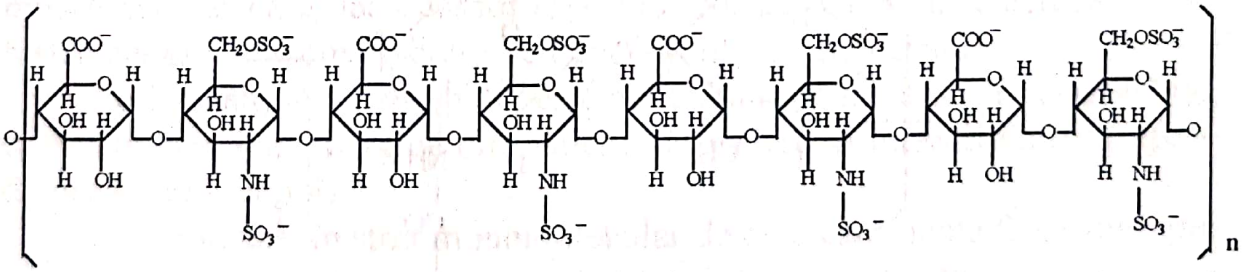


Fig. 4.15. Structura unităţii repetabile a lanţului de heparină

Sulfatul de heparină este o mucopolizaharidă dextrogiră şi conţine cantităţi echimoleculare de resturi de glucozamină, acid uronic, acetil şi sulfat (fig. 4.16.).

Pe baza compoziţiei sale, s-a sugerat că unitatea care se repetă poate să fie o tetrazaharidă, o grupă N–acetil, una N–sulfat şi o grupă O–sulfat. În consecinţă, sulfatul de heparină poate să fie un copolimer al dizaharidelor în

care fragmentul de glucozamină are O–sulfaţi şi un fragment de dizaharide care au N–acetilglucozamină.

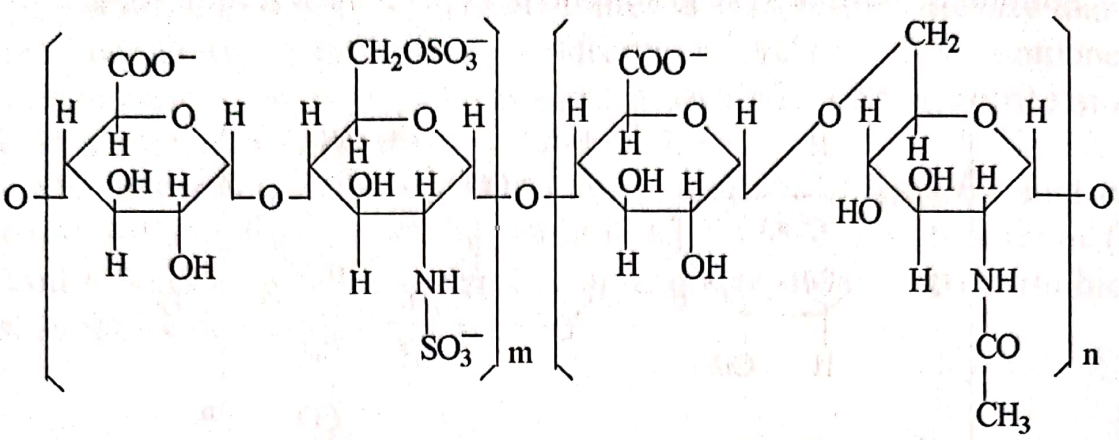


Fig. 4.16. Structura unităţii repetabile a sulfatului de heparină

4.5.1.5. SULFATUL DE KERATAN

Sulfatul de keratan a fost semnalat în corneea de bovine, unde reprezintă aproape jumătate din totalul mucopolizaharidelor prezente. Unitatea care se repetă este N–acetillactozamina sulfatată în C-6 al fragmentului de glucozamină. Ea este polimerizată la legătura 1→ 3 glicozidică (fig. 4. 17.)

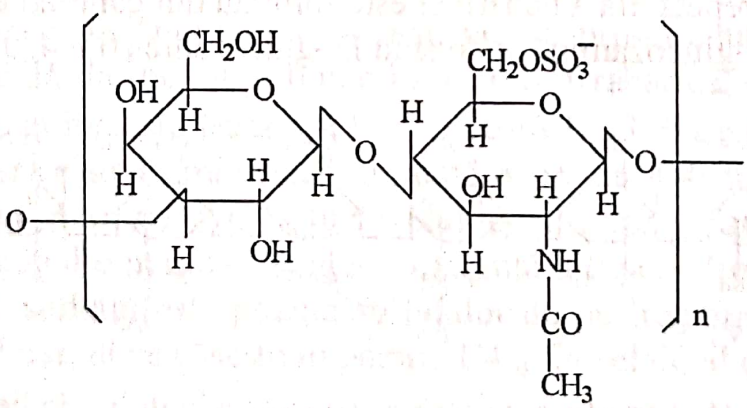


Fig. 4.17. Structura unităţii repetabile a sulfatului de keratină

4.5.1.6. HIDRATAREA MUCOPOLIZAHARIDELOR

Mucopolizaharidele din ţesuturi se găsesc în diferite stadii de hidratare şi formează geluri sau soluţii concentrate. În matricea tisulară, mucopolizaharidele sunt răspunzătoare de îmbibarea şi retenţia de apă.

Scanned with OKEN Scanner

La hidratare, au importanţă următorii factori:
– capacitatea de sorbţie a apei;
– capacitatea de retenţie a mucopolizaharidelor;
– energia procesului de sorbţie.

Capacitatea de sorbţie a apei se defineşte prin cantitatea de apă de hidratare a unui eşantion solid de mucopolizaharidă la o anumită presiune de vapori.

Capacitatea de sorbţie a apei este caracterizată de izoterma de sorbţie, care reprezintă cantitatea de apă de hidratare, în grame sau moli de apă pe gram sau unitate de polimer la o anumită temperatură (fig. 4.18).

Majoritatea izotermelor mucopolizaharidelor, pentru sorbţia vaporilor de apă, au o formă generală de S.

Izoterma sorbţiei poate fi analizată cu ecuaţia Brunauer, Emmett şi Teller:

$$\frac{P / P_0}{a(1 - P / P_0)} = \frac{1}{Am\ C} + \frac{(C - 1)\ P / P_0}{Am\ C}$$

unde:
– P / P_0 = presiunea relativă a vaporilor;
– a = cantitatea de apă absorbită la fiecare presiune relativă de vapori;
– Am = cantitatea de apă absorbită la formarea stratului molecular;
– C = un termen care este egal cu căldura netă de sorbţie.

Din figura 4.18., rezultă că procesul de hidratare şi deshidratare nu urmează aceeaşi cale, iar deosebirea este raportată ca fiind histereza. Bucla histerezei este măsura gradului de ireversibilitate a procesului.

La început, matricea solidă este hidratată la grupele polare disponibile, care sunt cele mai energice din punctul de vedere al interacţiunilor (dipol–dipol sau ion – dipol).

Se formează un strat monomolecular de apă, care poate fi evaluat prin alcătuirea graficului $[P / P_0] / a[1 - P / P_0]$ faţă de P / P_0. Până la presiunea relativă a vaporilor de circa 0,3 – 0,5 atm se obţine o linie dreaptă. După ce stratul monomolecular de apă se completează izoterm, prezintă o creştere gradată, concomitent cu creşterea presiunii de vapori. Stratul monomolecular de apă de la grupele polare este capabil să reţină alte molecule de apă. În cazul polimerilor, este un proces de umflare.

Scanned with OKEN Scanner

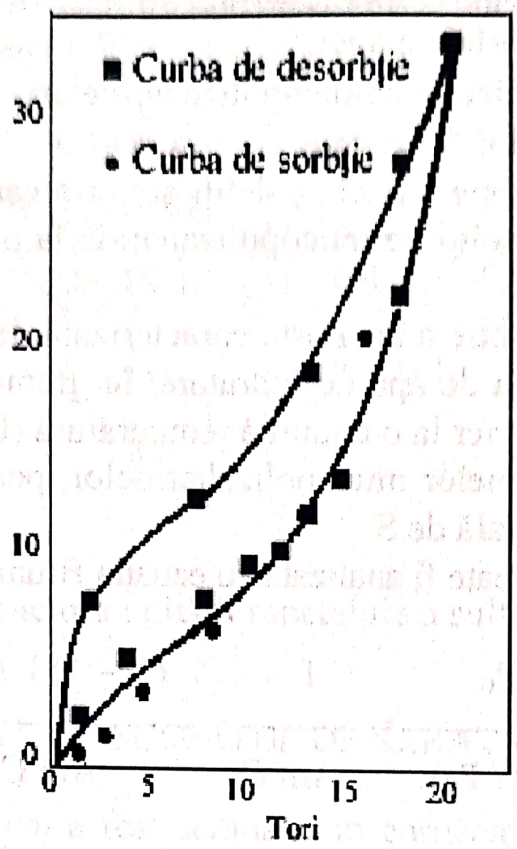


Fig. 4.18. Izoterma şi histerezisul de sorbție a hialuronatului de sodiu semicristalin la temperatura de 24°C

Se remarcă apoi o tendință de creştere accentuată a izotermei de sorbție; are loc sorbția unei cantități mai mari de apă la o modificare mică a presiunii vaporilor. Acest proces este asociat cu condensarea capilară a apei în microporii matricei solide, iar în cazul umflării, are loc un proces de dizolvare.

Acidul hialuronic are un volum hidrodinamic mare, care este estimat la 200 – 500 ml / g.

Grupele polare ale mucopolizaharidelor responsabile în procesul de hidratare au importanță în următoarea ordine descrescătoare: –OH, –NH, $-SO_3^-$, $-COO^-$, $-NH_2$.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă:

1. Nenițescu, C.D., *Chimie Organică*, vol. I şi II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980

2. Lehninger, A.L., *Biochimie*, vol. I şi II, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, 1992

3. Chiriță, Gh., Chiriță, M., *Chimia pielii*, Editura I.P.I., 1987

4. Elden, R.H., *Biophisycal Properties of the Skin*, vol. I, Wiley – Interscience, Inc. New York, London, Sydney, Toronto

5. Tomasik, P., *Chemical and Function Properties of Food Saccharides*, C.R.C. Press, USA, 2003

6. Rosenberg, A., *Biological roles of sialic acid*, Plenum Press, New York, 2006

7. Gottschalk, A., *Glycoproteins: Composition, Structure and Function*, ed. II, vol. II, Elsevier, Amsterdam, 1972

8. Pigman, W.W., Horton, D., *The Carbohydrates*, vol. IA and 1B, Academic Press, New York, 1972

9. Thisbe, K. Lindhorst, *Struktur und Funktion von Kohlenhydraten*, Chemie in unserer Zeit, 2 000, 34, 1, pp. 38 – 52

10. Lehmann, J., *Kohlenhidrate. Chemie und Biologie. Thieme*, Stuttgart, New York, 1996, 2001 (2 Auflage)

11. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cocs, M.M., (eds), *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 1993

12. Martin, A., Rambal, C., Berger, V., Perier, S., Louisot, P., *Biochemie*, 1998, 80, pp. 75 – 86

13. Popescu, A., Cristea, E., Zamfirescu – Gheorghiu, M., *Biochimie Medicală*,
Editura Medicală, Bucureşti, 1980

14. Becker, H., Berger, W., Domschke G., *Organicum*, Editura Ştiințifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1982.

15. Jurcoane, Ş., Cornea, P., Stoica, I., Vassu, T., *Tratat de Biotehnologie*, vol. I, Editura Tehnică, Bucureşti, 2004.

16. Beral, E., Zapan, M., *Chimie Organică*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1973.

17. Felszeghy, E., Abraham, A., *Biochimie*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1972.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

LIPIDE

5.1. Introducere	**174**
5.2. Lipidele complexe	**175**
5.2.1. Gliceridele	**175**
5.2.1.1. Proprietăţile fizice şi chimice ale gliceridelor	**177**
5.2.2. Acizii graşi	**179**
5.2.3. Alchileteracilglicerolii	**181**
5.2.4. Glicozilacilglicerolii	**182**
5.2.5. Fosfogliceridele	**182**
5.2.6. Sfingolipidele	**185**
5.2.6.1. Sfingomielinele	**186**
5.2.6.2. Glicosfingolipidele neutre	**186**
5.2.6.3. Glicosfingolipidele acide	**187**
5.2.7. Cerurile	**188**
5.3. Lipidele simple	**189**
5.3.1. Terpenele	**189**
5.3.2. Steroidele	**191**
5.3.3. Prostaglandinele	**195**
Bibliografie	***196***

5.1. INTRODUCERE

Lipidele sunt biomolecule insolubile în apă şi se pot extrage din celule şi ţesuturi cu ajutorul solvenţilor organici nepolari (eterul de petrol, eterul etilic, benzenul, cloroformul etc.).

Lipidele au o serie de funcţii biologice: fac parte din structura membranelor celulare, sunt componente ale suprafeţei celulare, au rol de înveliş

Scanned with OKEN Scanner

protector al suprafeței multor organisme. Substanțe din clasa lipidelor, cum sunt unele vitamine și hormoni etc., au importante activități biologice, asigură rezerva de energie predominant în formă de trigliceride, acizii lipofilici ai bilei ajută la solubilizarea lipidelor etc.

Lipidele se află uneori combinate covalent sau prin legături slabe cu alte clase de biomolecule, formând molecule hibride: glicolipide, lipoproteine.

Lipidele se pot grupa în *lipide simple* (*terpene, steroizi, prostaglandine)*, care nu conțin acizi grași și deci nu sunt saponificabile, deoarece prin hidroliză alcalină, nu formează săpunuri și *lipide complexe,* care sunt saponificabile, se caracterizează prin prezența, în structura lor, a acizilor grași; acestea cuprind *gliceride, fosfogliceride, sfingolipide* și *ceruri* și se deosebesc între ele prin natura catenei de care sunt legați covalent acizii grași.

5.2. LIPIDELE COMPLEXE

5.2.1. GLICERIDELE

Gliceridele (acilglicerolii sau materiile grase) reprezintă o clasă de substanțe deosebit de importantă pentru animale și plante. Acilglicerolii se găsesc în toate țesuturile și lichidele organismului animalelor, sunt componente structurale, reprezintă o rezervă de hrană și energie și sunt dizolvanți ai vitaminelor liposolubile.

Materiile grase vegetale și animale se găsesc în cantități mari și se obțin din următoarele surse:

– Materiile grase vegetale se găsesc în semințe (in, cânepă, soia, mac, bumbac, floarea-soarelui, ricin, struguri, tomate), fructe (măslin, palmier, fag), tuberculi (arahide), germeni (porumb).

– Materiile grase la animalele terestre se găsesc sub formă de seuri (bovine, ovine, caprine), unturi (porc, pasăre), grăsimi din lapte (vacă, oaie, capră), la animalele marine și pești: uleiuri de pești, ulei de ficat de morun, grăsime de focă, morsă, balenă.

Acilglicerolii sunt esteri ai glicerolului cu acizii grași. Când toate cele trei grupe hidroxilice ale glicerolului sunt esterificate cu acizi grași rezultă triacil-glicerolul.

Triacilglicerolii reprezintă clasa cea mai numeroasă de lipide și reprezintă componentele cele mai importante cantitativ ale lipidelor de depozit din celulele vegetale și animale. Triacilglicerolii solizi la temperatura ambiantă sunt denumiți grăsimi, iar cei lichizi, uleiuri. Diacilglicerolii (digliceride)

Scanned with OKEN Scanner

şi monoacilglicerolii (monogliceride) se găsesc în stare naturală, dar în cantităţi mult mai mici (fig. 5.1).

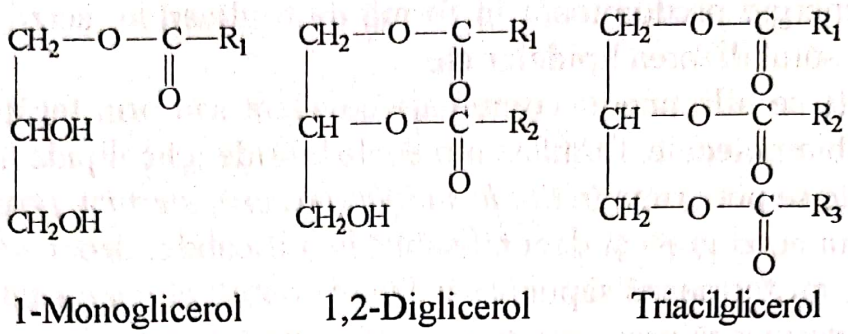
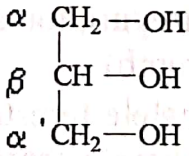


Fig. 5.1. Mono-, di- şi trigliceroli

Triacilglicerolii care au un singur tip de acid gras în toate cele trei poziţii în care se poate face esterificarea se numesc *triacilgliceroli simpli* (tripalmi-toilglicerol, sau tripalmitină, trioleoilglicerol sau trioleină etc.). Triacilglice-rolii micşti conţin doi sau trei acizi graşi diferiţi (exemple, 1–palmitoildiste-aroilglicerol sau 1–palmitodistearină). Grăsimile naturale sunt, de obicei, amestecuri complexe de triacilgliceroli simpli şi micşti, la care pot participa acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi.

Proprietăţile gliceridelor (acilglicerolilor) depind de natura acizilor graşi şi de proporţia în care ei sunt conţinuţi în glicerida respectivă. Acidul gras dominant influenţează, în mod deosebit, proprietăţile fizico-chimice ale gliceridei. Proprietăţile gliceridelor depind şi de felul cum sunt poziţionaţi aceşti acizi graşi în moleculă.

Glicerolul are două funcţii alcoolice primare (α,α') şi o funcţie alcoolică secundară (β):



Cercetările întreprinse de P. Savary şi F. Mattson asupra structurii gliceridelor prin hidroliză cu lipază, au dus la următoarele concluzii:

– unii acizi graşi ocupă, în unele uleiuri şi grăsimi, poziţii bine determinate;

– la majoritatea materiilor grase naturale, acizii graşi saturaţi se leagă, în special, la funcţiile alcoolice primare ale glicerolului, în poziţiile α şi α′, iar acizii graşi nesaturaţi se leagă, cu predilecţie, la funcţia alcoolică secundară β.

O particularitate, față de cele afirmate mai sus, o prezintă grăsimea de porc la care gliceridele sale au legați acizii grași nesaturați, cu predilecție, la funcțiile alcoolice primare, în pozițiile α și α′, iar poziția internă β este ocupată de acizii grași saturați.

Monoacilglicerolii și diacilglicerolii se utilizează în industria alimentară, deoarece sunt digestibili și utilizabili biologic. Acilglicerolii, sub acțiunea acizilor, bazelor, a lipazelor hidrolizează la acizi grași și glicerol.

5.2.1.1. PROPRIETĂȚILE FIZICE ȘI CHIMICE ALE GLICERIDELOR

Proprietățile fizice ale gliceridelor depind de natura acizilor grași participanți în structură, de masa lor moleculară, de gradul de nesaturare, de natura și cantitatea substanțelor însoțitoare.

Aciditatea liberă a unei gliceride este caracterizată prin *indicele de aciditate*, care este cantitatea de KOH în mg necesară a neutraliza, la rece, un gram de materie grasă.

După consistența lor, gliceridele (materiile grase) sunt solide, semisolide sau lichide la temperatura camerei, grupându-se în:

- uleiuri, care sunt lichide până la temperatura de –15°C;
- grăsimi și unturi, care se topesc la 20°–30°C;
- seuri, care se topesc peste 35°C.

În general, uleiurile provin din plante, dar sunt și uleiuri de pește, de ficat de morun, de la unele animale marine; grăsimile, unturile și seurile se găsesc în organismele animalelor, iar untul de cacao se obține din fructele arborelui de cacao.

Prin încălzire, materiile grase solide se topesc, de obicei, până la 50°C, iar peste 250°C, încep să se descompună.

Greutatea specifică a gliceridelor este de 0,910 – 0,970 g / cm^3. La același număr de atomi de carbon în moleculă, acizii grași nesaturați au o greutate specifică mai mare decât a acelor saturați.

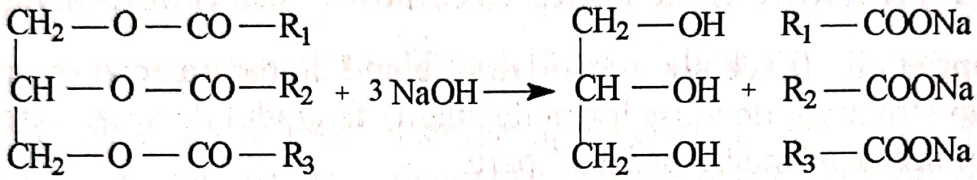
Gliceridele sunt insolubile în apă și solubile în solvenți organici: eter etilic, benzină, benzen, sulfură de carbon, toluen, acetonă, hidrocarburi clorurate. Toate gliceridele sunt insolubile în alcool etilic, cu excepția uleiului de ricin, care are o grupă hidroxil. Acizii grași se solvă în aceiași solvenți organici, dar și în alcool etilic. Solubilitatea lor este cu atât mai mare, cu cât au masa moleculară mai mică și cu cât sunt mai saturați.

Punctul de topire al trietilgliceridelor este determinat de natura acizilor grași saturați din compoziția lor.

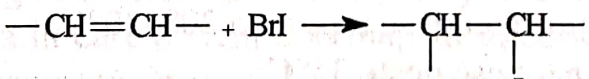
Scanned with OKEN Scanner

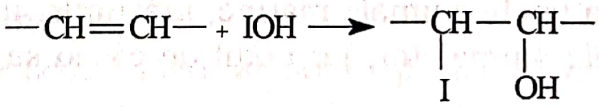
Reacţiile chimice ale gliceridelor au loc la nivelul grupei carboxilice libere sau esterificate şi în catena acizilor graşi.

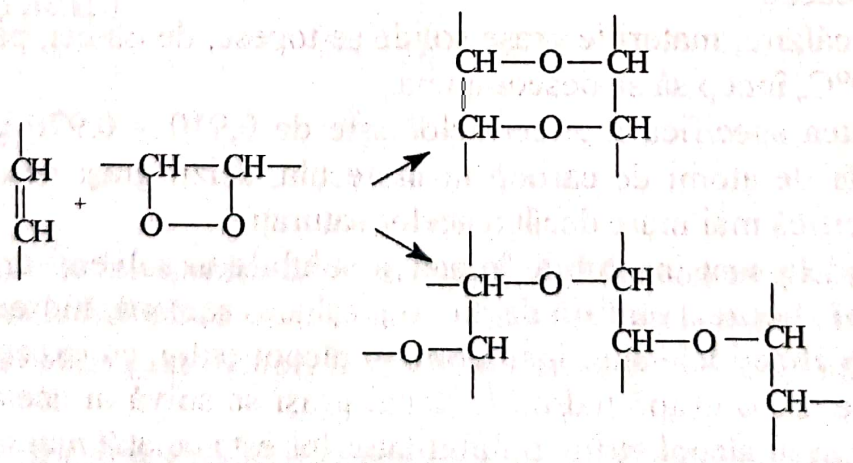
La nivelul grupei carboxilice, pot avea loc, printre altele, reacţii de hidroliză, când acestea sunt esterificate şi reacţii de saponificare. Hidroliza gliceridelor se produce rapid sub influenţa catalizatorilor (baze, acid sulfuric, oxizi de magneziu, de zinc, enzime specifice etc.). În urma hidrolizei alcaline, de exemplu, cu hidroxid de sodiu sau potasiu, gliceridele se transformă în glicerol şi sarea de sodiu sau potasiu a acizilor graşi, numite săpunuri, iar reacţia poartă numele de *saponificare*:

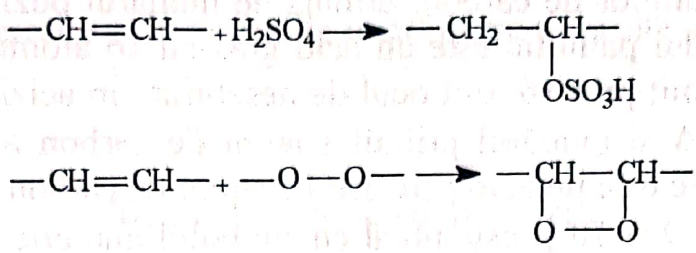


Adiţia este o proprietate a acizilor graşi nesaturaţi. Legăturile duble ale acizilor graşi din diversele gliceride, în anumite condiţii, adiţionează halogenii (clor, brom, iod), hidrogenul, oxigenul, sulful, acidul sulfuric, ca în exemplele de mai jos:

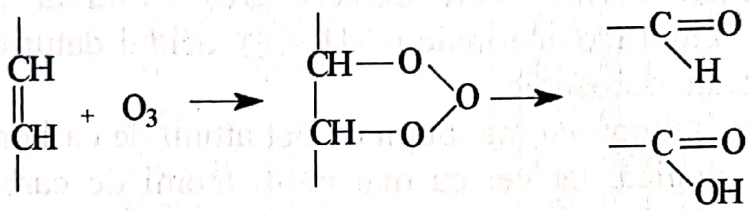








Ozonul adiționează la dubla legătură şi se formează oxonide, care sunt nestabile şi trec în acizi şi aldehide, cu catene a căror lungime este cam jumătate din lungimea acidului gras de la care s-a plecat, deoarece majoritatea legăturilor duble sunt situate începând cu jumătatea lungimii catenei:



Uleiurile care conţin acizi graşi nesaturaţi (acizii linolenic, linolic, oleostearic etc.), în contact cu aerul, în timp, îşi măresc consistenţa şi în strat subţire formează pelicule. Proprietatea materiilor grase lichide de a se usca formând pelicule se numeşte *sicativitate*. Acţiunea oxigenului în procesul de sicativare se intensifică mult dacă sunt prezenţi agenţi de sicativare, cum sunt: săpunurile de cobalt, mangan, plumb, săpunurile rezinice şi naftenice etc.

5.2.2. ACIZII GRAŞI

Acizii graşi se găsesc în cantităţi foarte mari în lipidele saponificabile din plante, animale şi microorganisme şi doar sub formă de urme în unele celule şi ţesuturi.

Acizii graşi au două roluri majore în organism: în calitate de componente a multor complexe lipidice din membrane şi în calitate de componente a rezervei de grăsime sub formă de trigliceride. Toţi sunt formaţi din lanţuri lungi de hidrocarburi aciclice cu o grupă carboxil terminală. La pH-ul fiziologic, grupa carboxil este în stare ionizată. Lanţul hidrocarbonat poate fi saturat ca în acizii palmitic, stearic etc. (acizi graşi saturaţi) sau poate avea una sau mai multe legături duble, ca în acizii oleic, linoleic, linolenic etc. (acizi graşi nesaturaţi). Numărătoarea carbonilor acizilor graşi începe cu carbonul de la grupa carboxilică. Indicarea numerică folosită pentru acizii graşi începe

de la numărul atomilor de carbon, urmată de numărul pozițiilor nesaturate. De exemplu, acidul palmitic este un acid gras cu 16 atomi de carbon, este saturat şi este numit prin 16: 0. Locul de nesaturare în acizii graşi este indicat cu simbolul Δ şi numărul primului atom de carbon a dublei legături. Astfel, acidul oleic este un acid care are 18 atomi de carbon şi o legătură dublă între carbonii 9 şi 10 şi este notat cu simbolul numeric 18: $1^{\Delta 9}$. Dublele legături sunt cis, dacă nu este nici o altă precizare suplimentară.

Cei mai mulți acizi graşi din plante şi animale au un număr par de atomi de carbon, cu lanțuri ce au 4 până la 26 atomi de carbon, predominând cei cu 16–18 atomi de carbon. Acizii graşi cu număr impar de atomi de carbon se găsesc doar sub formă de urme la animalele terestre şi în cantități mai mari în organismele marine. Astfel de acizi graşi cu număr impar de atomi de carbon sunt: acidul izovalerianic ($C_5H_{10}O_2$), acidul daturic ($C_{17}H_{34}O_2$) şi izomerul său, acidul dorosonic.

Acizii graşi saturați cu mai puțin de opt atomi de carbon sunt lichizi la temperatura fiziologică, iar cei cu mai mulți atomi de carbon sunt solizi. Prezența dublelor legături în acizii graşi coboară semnificativ punctul de topire față de acizii graşi saturați.

Majoritatea acizilor graşi din organism provin din alimentație, cu toate că celulele organismului pot sintetiza diferiții acizi graşi necesari, cu excepția acizilor linoleic şi γ–linolenic, care sunt considerați acizi graşi esențiali şi nu pot fi obținuți decât din alimentație. În uman, acizii graşi esențiali pot fi obținuți consumând diferite plante sau carnea animalelor care s-au hrănit cu astfel de plante. Acidul linoleic reprezintă 10 – 20 % din totalul de acizi graşi din compoziția trigliceridelor şi fosfogliceridelor. Acizii graşi esențiali sunt precursori ai biosintezei prostaglandinelor, compuşi de tip hormonal, care în cantități foarte mici, au efecte însemnate asupra activității fiziologice. În tabelul 5.1., se dau principalii acizi graşi importanți din punct de vedere fiziologic.

Acizii graşi nesaturați dau reacții de adiție la legăturile duble din structura lor. Titrarea cantitativă cu iod sau brom determină numărul relativ de legături duble din acizii graşi sau lipide.

Dintre toți acizii graşi din grăsimile naturale, acidul oleic este cel mai răspândit. În foarte multe grăsimi, el reprezintă mai mult de jumătate din totalul greutății acizilor şi numai în puține grăsimi, apare în proporție mai mică de 10 %.

Acidul palmitoleic şi acidul linolic, acidul stearic, acidul miristic sunt extrem de răspândiți, dar într-o proporție mai mică decât acidul oleic. Acidul stearic se găseşte într-o proporție de circa 25 % în grăsimile de rezervă ale

Scanned with OKEN Scanner

unor mamifere terestre şi în grăsimile unor plante tropicale, cum este untul de cacao.

Tabelul 5.1.

Principalii acizi graşi fiziologici

Simbolul numeric	Numele	Structura chimică
	Acizi graşi saturaţi	
12: 0	Acid lauric	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
14: 0	Acid miristic	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
16: 0	Acid palmitic	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
18: 0	Acid stearic	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
20: 0	Acid arahic	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
24: 0	Acid lignoceric	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
	Acizi graşi nesaturaţi	
$16: 1^{\Delta 9}$	Acid palmitoleic	$CH_3(CH_2)_5CH = CH(CH_2)_7COOH$
$18: 1^{\Delta 9}$	Acid oleic	$CH_3(CH_2)_7CH = CH(CH_2)_7COOH$
$18: 2^{\Delta 9,12}$	Acid linoleic	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
$18:3^{\Delta 9,12,15}$	Acid linolenic	$CH_3CH_2CH=(CHCH_2CH)_2=CH(CH_2)_7COOH$
$20: 4^{\Delta 5,8,11,14}$	Acid arahidonic	$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_4(CH_2)_3COOH$

5.2.3. ALCHILETERACILGLICEROLII

Alchileteracilglicerolii, înrudiţi cu triacilglicerolii, sunt larg răspândiţi, dar se găsesc în cantităţi mult mai mici. În aceşti compuşi, două grupe hidroxilice ale glicerolului sunt esterificate cu acizii graşi, iar a treia grupare hidroxil formează un eter cu un lanţ lung alchil sau alchenil.

Alchileteracilglicerolii supuşi hidrolizei enzimatice sau cu soluţii slab alcaline pierd acizii graşi din moleculă şi se formează glicerileterii, ca alcoolii chimilic şi batilic (fig. 5.2.) (1).

Scanned with OKEN Scanner

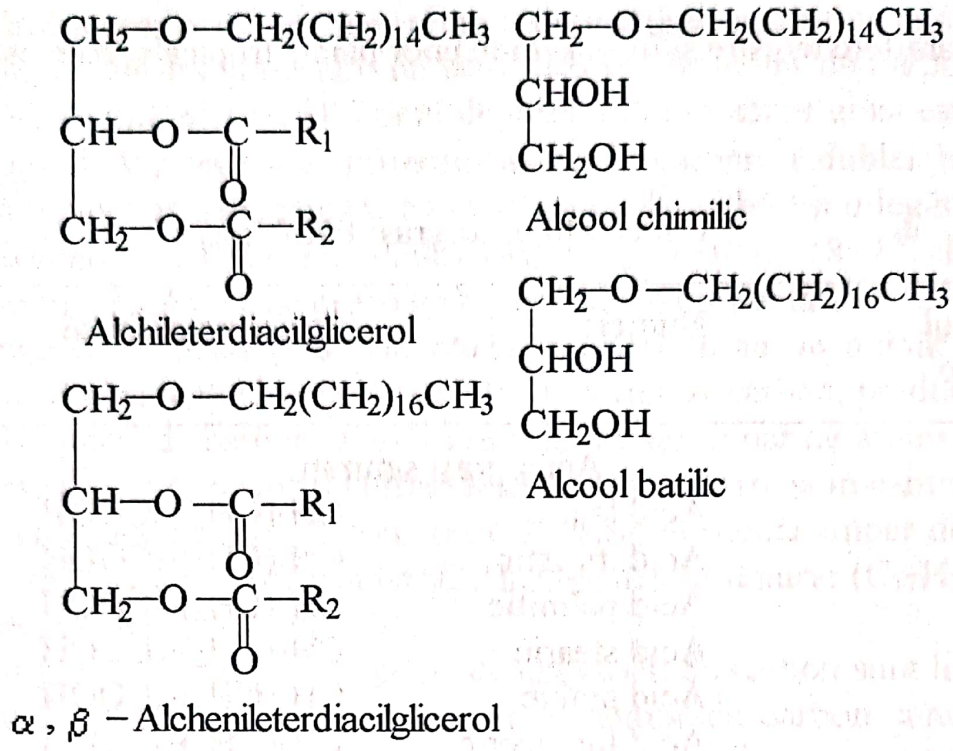


Fig. 5.2. Alchileteracilgliceroli şi glicerileteri

5.2.4. GLICOZILACILGLICEROLII

Glicozilacilglicerolii sunt acilgliceroli care conţin un glucid legat glicozidic cu gruparea 3–hidroxilică, neesterificată, a diacilglicerolilor. *Galactozil-diacilglicerolul* (Fig. 5.3.) este prezent în neuronii vertebratelor şi în plantele superioare. Se cunosc şi alţi glicozilacilgliceroli cu di- şi trizaharide.

5.2.5. FOSFOGLICERIDELE

Fosfogliceridele sau fosfatidele sau glicerol fosfatidele sunt lipidele care, la hidroliză, în afară de glicerol şi acizi monocarboxilici superiori dau şi un acid fosforic şi un aminoalcool. Fosfogliceridele sunt componente ale membranelor celulare şi, de asemenea, se găsesc şi în alte compartimente ale celulelor, în cantităţi foarte mici. Sunt mult răspândite în plante şi animale, mai ales în gălbenuşul de ou, creier, inimă şi ficat, iar în cantităţi mici, în seminţele oleaginoase (rapiţă, soia etc.).

Scanned with OKEN Scanner

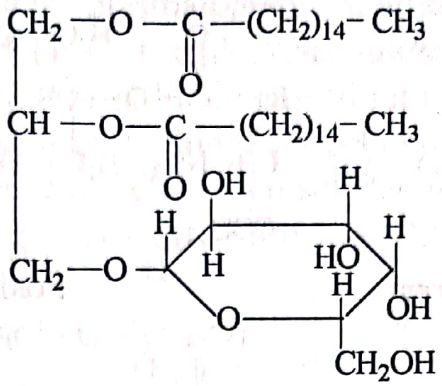


Fig. 5.3. Un galactozildiacilglicerol

În fosfogliceride, una din grupările hidroxilice primare ale glicerolului este esterificată cu acid fosforic, iar celelalte grupări hidroxilice sunt esterificate cu acizi graşi (fig. 5.4.).

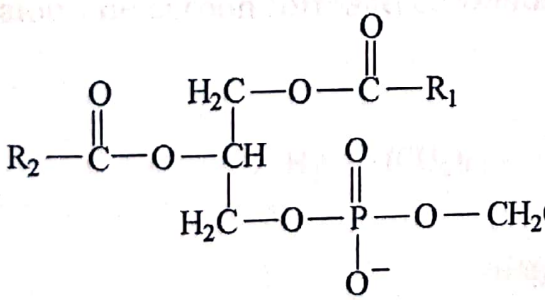
Se disting două clase de fosfogliceride, *lecitinele*, respectiv *fosfatidilcolina* şi *cefalinele* (*fosfatidiletanolamina*), care se deosebesc prin aminoalcoolul lor: *colina* în cazul lecitinelor şi *colamina* (etanolamina) în cazul cefalinelor. La unele cefaline, în loc de colamină, s-a găsit aminoacidul serina:

$HOCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3HO^-$ Colina

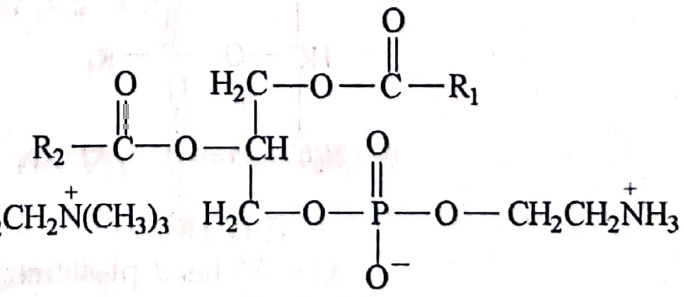
$HOCH_2CH_2NH_2$ Colamina

$HOCH_2CH(NH_2)COOH$ Serina

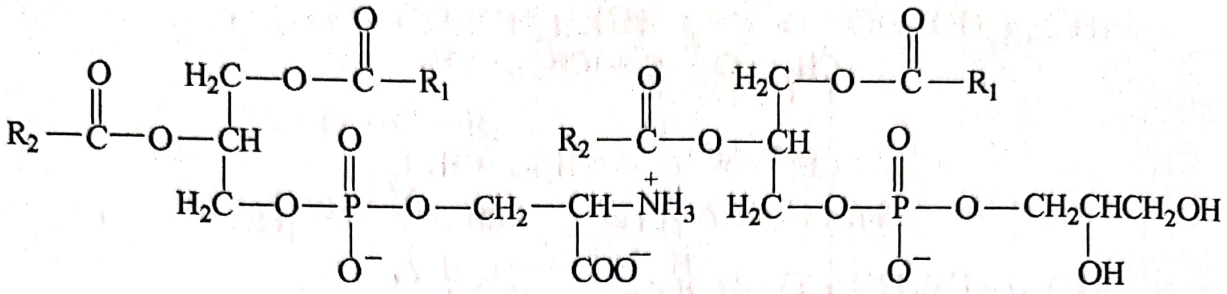
Lecitinele sunt solubile în alcool şi eter, iar cefalinele numai în eter. Datorită caracterului lor de ioni bipolari, formează soluţii coloidale în apă. Fosfatidele sunt agenţi cu activitate superficială şi prin aceasta, au un rol important de regulatori ai permeabilităţii membranelor celulare. De asemenea, contribuie la transportul grăsimilor în organismul animal, probabil şi la formarea grăsimii din lapte în glanda mamară.



Fosfatidilcolina

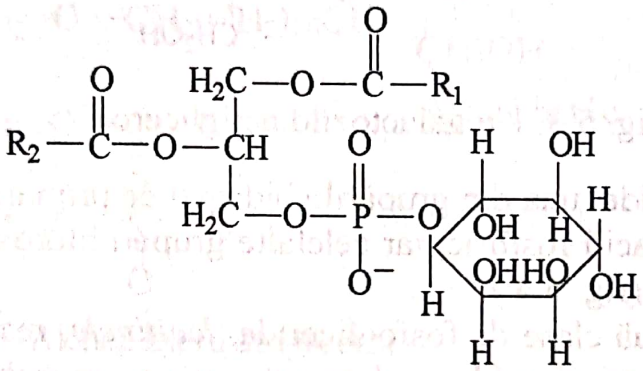


Fosfatildiletanolamina



Fosfatidilserina

Fosfatidilglicerol

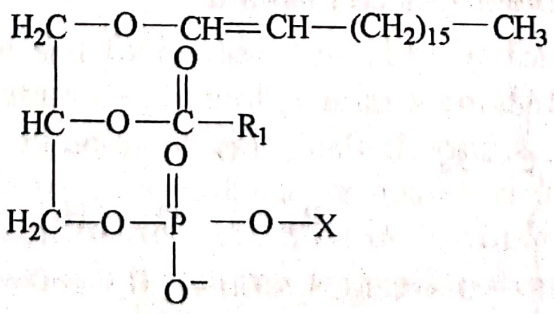


Fosfatidilinsitol

Fig. 5.4. Unele fosfogliceride mai răspândite în plantele superioare şi animale

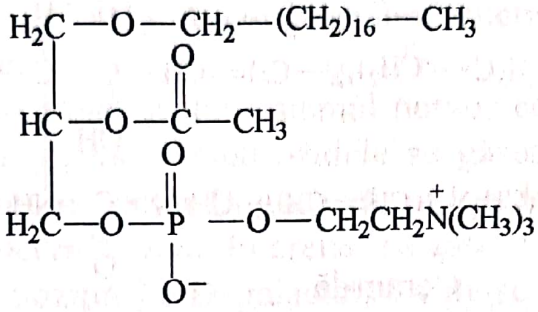
Acetalii fosfatidici, plasmalogenii, care însoţesc fosfogliceridele în multe organe, mai ales în complexul de membrană celulară, seamănă structural cu fosfolipidele şi, mai ales, cu fosfatidilcolina. Principala diferenţă este la acidul gras de la C – 1 (sn1) al glicerolului care conţine o O–alchil (-O–CH_2) sau O–alchenil eter (-O–CH = CH –).

Un exemplu cu O – alchenil eter este dat mai jos:



O – Alchenil plasmalogen

Unul dintre O – alchil plasmalogenii importanţi este factorul de activare a trombocitului: PAF (1–O–1–enil–2–acetiul–sn–glicero–3–fosfocolină), care funcţionează ca mediator al hipersensibilităţii, al reacţiilor acute inflamatorii şi al şocului anafilactic. Sinteza şi eliberarea PAF se produce ca replică în ficat, inimă, muşchii netezi, în ţesuturile uterine.



1- O - 1 - enil - 2 - acetil - sn - glicero - 3 - fosfocolin
Structura PAF

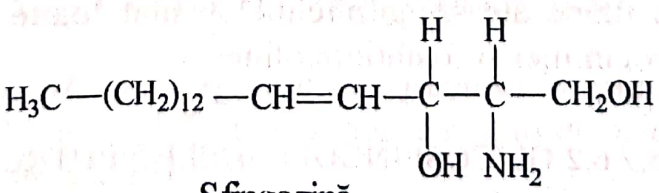
5.2.6. SFINGOLIPIDELE

Sfingolipidele sunt lipide complexe care au o catenă principală *sfingozina* sau un compus înrudit (fig. 5.5.) (1). Ele sunt componente importante ale membranelor celulelor animale şi vegetale (1).

Cantităţile cele mai mari de sfingolipide se găsesc în creier şi în ţesutul nervos, în timp ce în grăsimile de depozit, se găsesc doar sub formă de urme.

Sfingolipidele sunt constituite dintr-o moleculă de acid gras, o sfingozină sau un derivat al acesteia şi, la capăt, o grupare polară.

Sfingozina este unul din amino-alcoolii din sfingolipidele identificate. La mamifere, cele mai frecvente sunt sfingozina (4–sfingenina) şi dihidrosfingozina (sfinganina). Sfingozina se leagă cu gruparea sa aminică printr-o legătură amidică de un acid gras saturat sau nesaturat cu lanţ lung de 18 – 26 atomi de carbon formând *ceramida* (fig. 4.5.).



Sfingozină
(4–sfingenină)

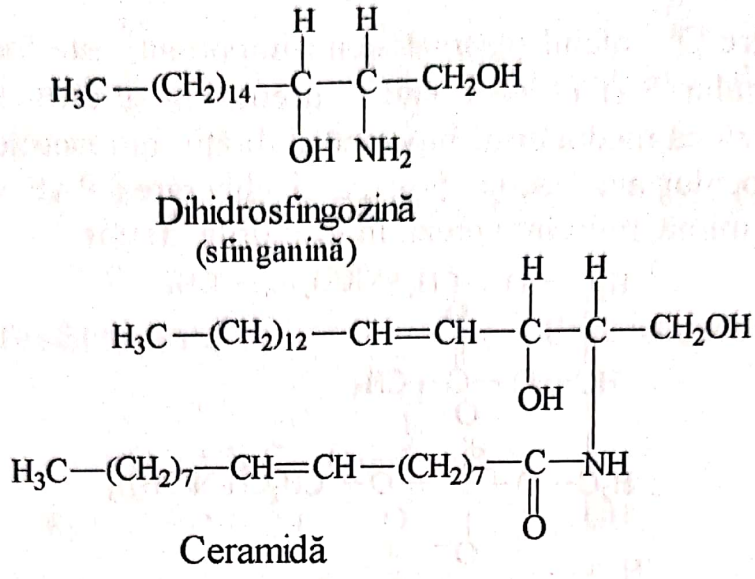


Fig. 5.5. Baze sfingozinice şi ceramidă

5.2.6.1. SFINGOMIELINELE

Sfingomielinele sunt sfingolipidele care se găsesc în cantitate mare în ţesuturile animalelor superioare. Ele au drept grupare polară esterificată cu gruparea 1–hidroxil dintr-o ceramidă, fosforil–colamina sau fosforil–colina (fig. 5.6.).

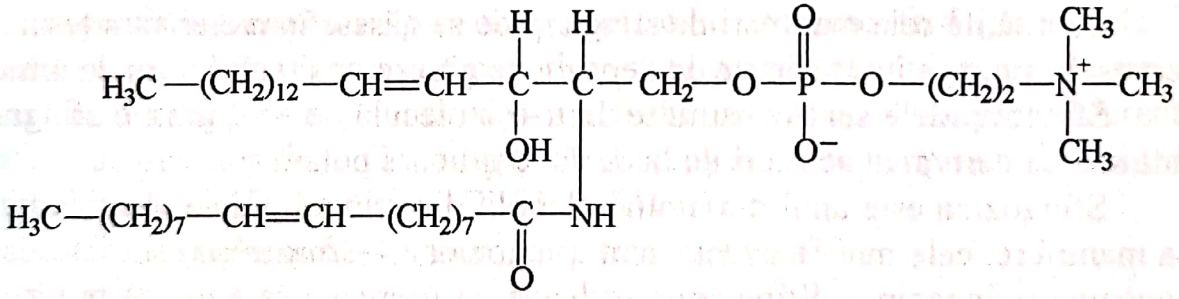


Fig. 5.6. Sfingomielină

Proprietăţile fizice ale sfingomielinelor sunt foarte asemănătoare cu cele ale fosfatidilcolaminei şi fosfatidilcolinei.

5.2.6.2. GLICOSFINGOLIPIDELE NEUTRE

Glicosfingolipidele neutre au, ca grupări polare, una sau mai multe glucide şi deci nu sunt încărcate electric.

Scanned with OKEN Scanner

Glicosfingolipidele neutre sunt componente ale suprafeței celulare din țesuturile animale. Unele glicosfingolipide neutre se găsesc la suprafața eritrocitelor, cărora le conferă specificitatea de grup sanguin.

Cele mai simple glicosfingolipide neutre sunt *cerebrozidele*, care au capul polar format dintr-un monozaharid legat β–glicozidic de gruparea hidroxil a ceramidei (fig. 5.7.) (1). Acizii graşi din structura cerebrozidelor au 22 – 26 atomi de carbon.

Cerebrozidele din creier şi din sistemul nervos conțin D–galactoză şi se numesc *galactocerebrozide*. Cerebrozidele se găsesc în cantități foarte mici în celelalte țesuturi şi conțin D–glucoză, în loc de D–galactoză şi, de aceea, se numesc *glucocerebrozide*. În creier, se găsesc şi esteri sulfat ai galactocerebrozidelor, în poziția 3 a D–galactozei, care se numesc *sulfatide* (1).

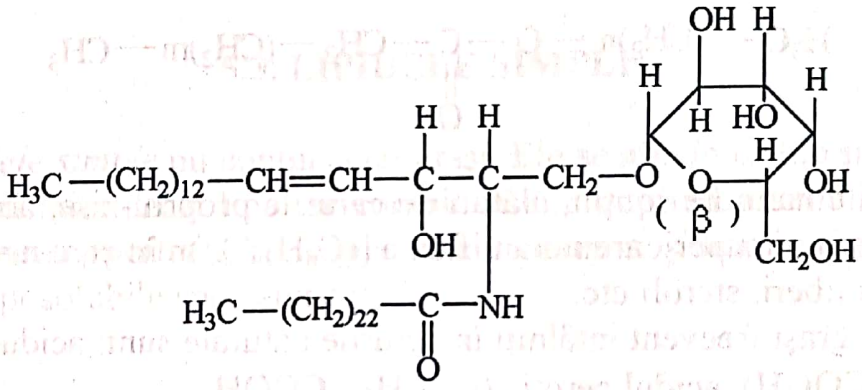


Fig. 5.7. Galactocerebrozidă

Unele glicosfingolipide neutre au ca grupări polare de cap o moleculă de dizaharid sau de trizaharid sau tetrazaharid şi se numesc *dihexozide, trihexozide sau tetrahexozide.*

Unitățile monozaharidice din glicosfingolipidele neutre sunt: D–glucoza, D–galactoza, N–acetil–D–glucozamina, N–acetil–D–galactozamina.

5.2.6.3. GLICOSFINGOLIPIDELE ACIDE

Glicosfingolipide acide (*gangliozide*) conțin în grupul oligozaharidic, ce formează capul polar, unul sau mai multe resturi de acid sialic, care conferă o sarcină negativă la pH = 7.

Gangliozidele se găsesc în cantitatea cea mai mare în materia cenuşie din creier, unde reprezintă 6 % din lipidele totale. S-au identificat mai multe gangliozide, care se deosebesc între ele prin numărul şi poziția radicalilor de

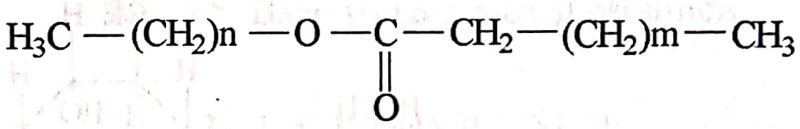
Scanned with OKEN Scanner

hexoză şi acid sialic care formează capul gangliozidelor. Aproape în toate gangliozidele, glucoza este glucidul care se leagă glicozidic cu ceramida.

5.2.7. CERURILE

Cerurile sunt esteri ai acizilor graşi superiori cu alcoolii monohidroxilici primari superiori sau cu sterolii. Sunt solide, insolubile în apă, la rece, sunt rigide, iar la cald, sunt moi şi pliabile. Sunt insolubile în alcool etilic şi solubile în mai mulţi solvenţi organici. Punctul lor de topire este mult mai ridicat decât al grăsimilor.

Structura lor poate fi reprezentată astfel:



Cerurile naturale conţin, alături de cerurile propriu-zise, acizi graşi liberi, hidrocarburi superioare neramificate [$(C_nH_{2n+2},)n$ în care n = 29 – 59], alcooli graşi liberi, steroli etc.

Acizii graşi frecvent întâlniţi în cerurile naturale sunt: acidul carnaubic (C_{25}– H_{47} –COOH), acidul cerotic (C_{25}–H_{51}–COOH.

Alcoolii graşi care intră în constituţia cerurilor naturale sunt saturaţi şi nesaturaţi. Alcoolii graşi saturaţi ($C_nH_{2n+2}O$) mai frecvenţi sunt: alcoolul lauric, alcoolul miristic, alcoolul palmitic (cetilic), alcoolul stearic, alcoolul carnaubic, alcoolul cerilic, alcoolul melisic. Alcoolul oleic ($C_{18}H_{35}OH$) este unul din mai puţinii alcooli graşi nesaturaţi ce se găsesc în ceruri.

Acizii şi alcoolii constituenţi ai cerurilor au, în majoritate, un număr par de atomi de carbon. Adesea, o ceară este alcătuită din alcoolul şi acidul cu acelaşi număr de atomi de carbon, de exemplu, stearatul de stearil ($C_{17}H_{35}$–COO–$C_{18}H_{37}$) din „albul de balenă“ sau ceroatul de ceril ($C_{25}H_{51}$–COO–$C_{26}H_{53}$) din ceara de albine. Cerurile au un indice de saponificare mult mai mic decât al grăsimilor, în schimb au un procent mult mai mare de nesaponificabile.

Cerurile naturale mai importante sunt: ceara de albine, lanolina, ceara de Coşenila, albul de balenă, uleiul de spermaceti, ceara de Carnauba, ceara de Palma, ceara Japonica, ceara Candelilla.

Scanned with OKEN Scanner

Ceara de albine constă, în principal, din esterii acidului palmitic cu alcoolul miristic, acid cerotic liber şi 10 % hidrocarburi.

Ceara de Carnauba se recoltează de pe frunzele palmierului *Copernicia cerifera* şi este compusă, în special, din esterul acidului cerotic cu alcoolul miristic.

Lanolina, grăsimea de lână, este un amestec de esteri ai acizilor graşi cu steroli ca lanosterolul şi agnosterolul.

Albul de balenă este ceara solidă care se obţine din grăsimea cetaceelor. Este compusă din esterii cetilici ai acizilor lauric, miristic, palmitic.

Ceara lichidă, numită şi *ulei de spermaceti*, este constituită din estreri ai alcoolului oleic cu acizi graşi superiori nesaturaţi.

5.3. LIPIDELE SIMPLE

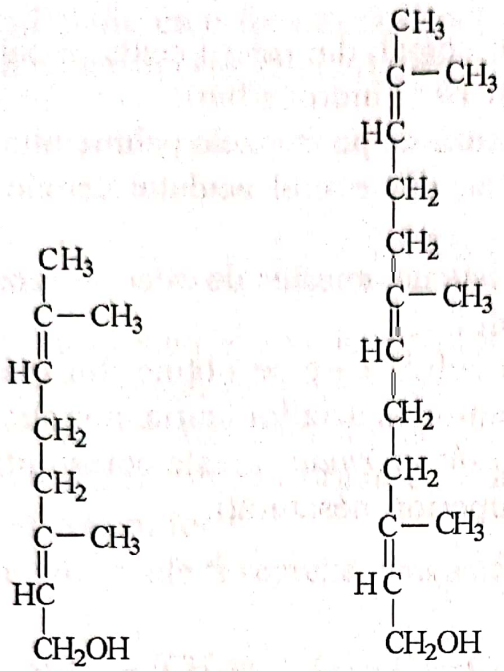
Lipidele simple nu conţin acizi graşi. Ele se află în celule şi ţesuturi, în cantităţi mai mici decât lipidele complexe, dar cuprind o serie de compuşi de foarte mare importanţă biologică (unele vitamine şi hormoni şi unele biomolecule liposolubile specializate).

5.3.1. TERPENELE

Terpenele sunt multipli ai izoprenului $\{CH_2=C(CH_3)—CH=CH_2\}$. Terpenele formate din două molecule de izopren se numesc *monoterpene*, cele formate din trei molecule de izopren sunt *sescviterpenele*, cele din patru molecule de izopren se numesc *diterpene*, din şase molecule de izopren, *triterpene* şi din opt molecule, *tetraterpene*.

Unele terpene sunt liniare, altele ciclice, iar unele au, în alcătuirea lor, ambele structuri (fig. 5.8. şi 5.9.).

Scanned with OKEN Scanner

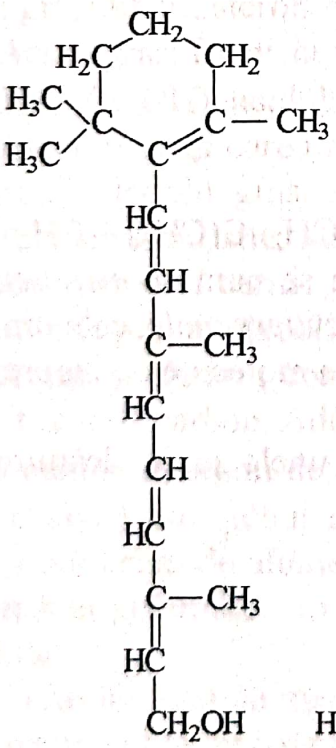


Geraniolul
Monoterpenă liniară

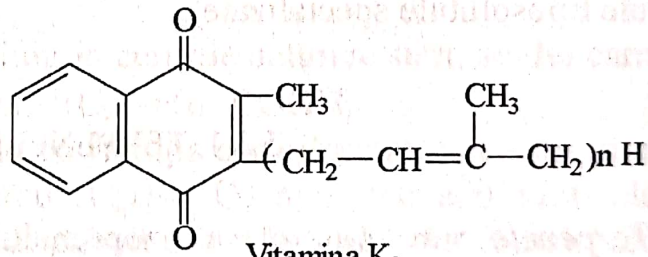
Farnesolul
Sescviterpenă liniară

Limonenul
Monoterpenă ciclică

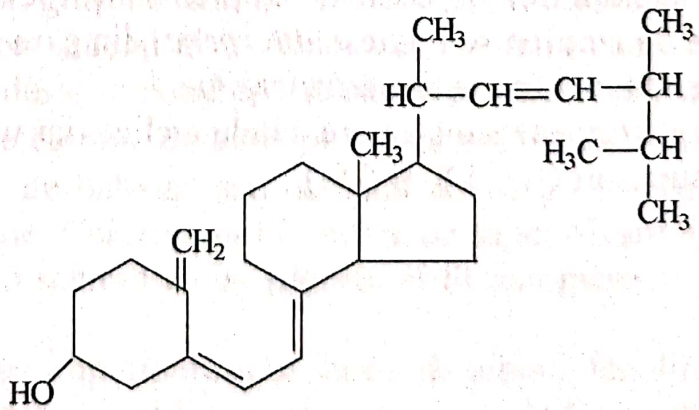
Fig. 5.8. Terpene liniare şi ciclice



Vitamina A

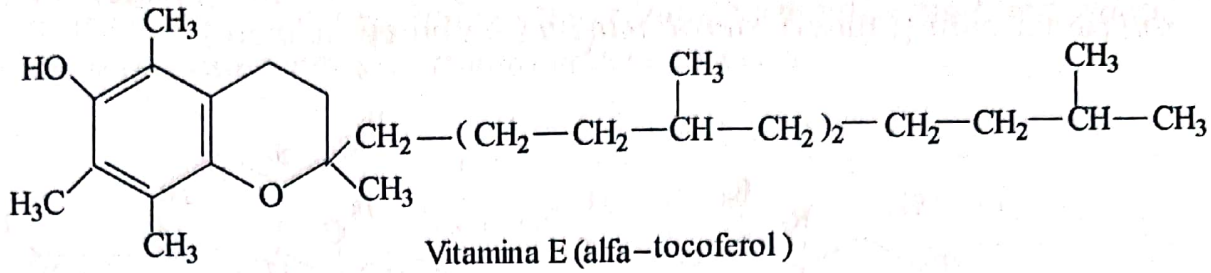


Vitamina K_2
n = 6, 7, 8, 9, 10



Vitamina D_2

Scanned with OKEN Scanner



Vitamina E (alfa–tocoferol)

Fig. 5.9. Vitaminele liposolubile A, D_2, K_2 şi E, compuşi izoprenoizi, lipide simple din categoria terpenelor

Dintre terpenele identificate în plante, cu arome sau mirosuri caracteristice, sunt monoterpenele: *camfor, carvonă, geraniol, limonen, mentol, pinen,* componente ale uleiurilor de camfor, chimion, muşcată, lămâie, mentă, terebentină. Un reprezentant al sescviterpenaelor este *farnezolul*, al diterpenelor este *fitolul* component al clorofilei, al triterpenaelor *este squalenul* precursor în sinteza colesterolului. Dintre tetraterpene se menţionează *carotinoidele* şi, în special, *β–carotenul*, precursor al vitaminei A.

Dintre terpenele deosebit de importante, sunt *vitaminele liposolubile A, E, K şi D* (fig. 5.9.).

5.3.2. STEROIDELE

Steroidele formează un grup mare de substanţe mult răspândite în natură şi toate posedă scheletul de carbon tetraciclic al 1,2–ciclopenteno–perhidrofenantrenului (fig. 5.10.).

Diferitele clase de steroide se deosebesc între ele prin natura substituenţilor şi gradul de nesaturare al nucleului tetraciclic, precum şi prin natura catenelor laterale R_1 şi R_3; R_2 este o grupă metil, cu excepţia aldosteronei. Poziţiile substituienţilor din moleculele steroidelor se notează ca în formula II fig. 5.10, care este scheletul colesterolului cu 27 atomi de carbon în moleculă (2). Nucleul ciclic al steroidelor (fig. 5.10. I şi II) posedă şapte centre de asimetrie la C_5 din ciclul A, C_8, C_9 şi C_{10} din ciclul B, C_{13}, C_{14} şi C_{17} din ciclul D. Punctele principale de substituţie sunt: carbonul 3 din ciclul A, carbonul 11 din ciclul C şi carbonul 17 din ciclul D.

Steroidele, după structura, originea şi însuşirile lor fiziologice, se compun din mai multe subgrupe, care au acelaşi schelet ciclic, dar se deosebesc prin grupele lor funcţionale şi catenele laterale.

Din rândul steroidelor, ne vom referi numai la *steroli* şi *acizi biliari.*

Sterolii sunt alcooli care se găsesc liberi sau esterificaţi cu acizi alifatici superiori în lipidele animalelor şi plantelor. După proveniență, sterolii se

Scanned with OKEN Scanner

pot clasifica în: *zoosteroli* (de la animale), *fitosteroli* (din plante), *micosteroli* (din drojdii şi fungi), *steroli marini* (din bureţi de mare).

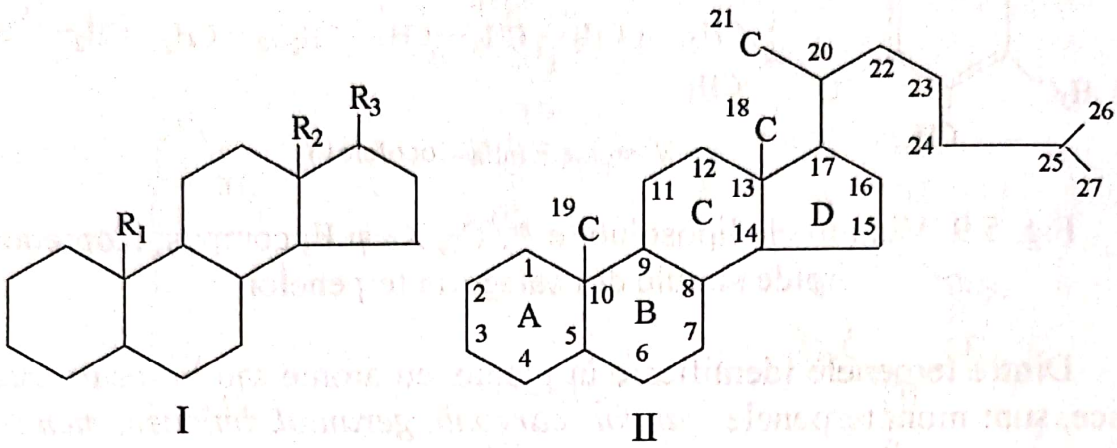
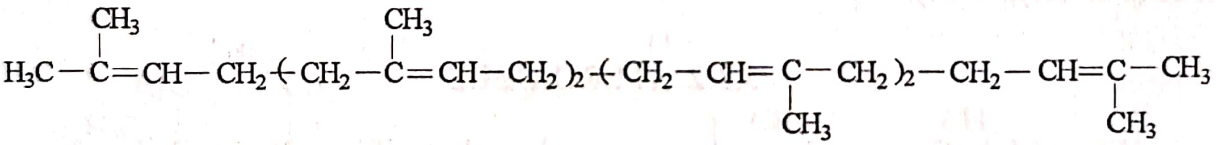


Fig. 5.10. (I) 1, 2 – ciclopenteno – perhidrofenantren;
(II) scheletul colesterolului cu 27 atomi de carbon în moleculă.

Toţi sterolii provin din triterpena liniară *squalen*:



Squalen

Primul produs important al ciclizării squalenului este *lanosterolul*, precursorul *colesterolului*, care este sterolul ce se găseşte în cantitatea cea mai mare la animale şi joacă un rol central în numeroase procese biochimice (fig. 5.11.).

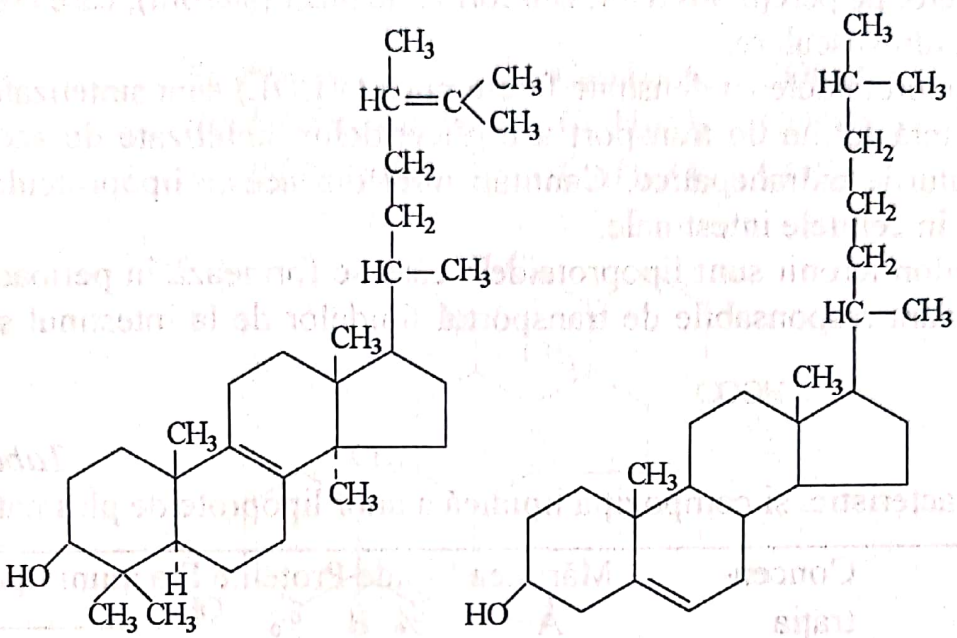
Molecula de colesterol conţine patru cicluri notate cu A, B, C, D (fig. 5.10), 8 carboni asimetrici (carbonii 3, 8, 9, 10, 13, 14, 17 şi 20), ceea ce face 2^8 sau 256 stereoizomeri, din care unul singur este levogir (3β–ol). Colesterolul posedă o grupă hidroxil la carbonul 3 (C_3), care este foarte hidrofobă şi poate fi esterificată cu un acid gras, ceea ce face colesterolul total insolubil în apă.

Colesterolul este prezent sub formă de steroizi (colesterol esterificat) în cea mai mare parte a ţesuturilor vertebratelor şi, în particular, în ficat, creier şi măduva spinării.

Colesterolul este precursorul multor alţi steroli în ţesuturile animale, ca de exemplu: *vitamina D, acizii biliari, hormonii sexuali feminini, estro-*

Scanned with OKEN Scanner

genii (estradiolul) şi gestogenii (progesterona), hormonii sexuali masculini, androgenii (testosterona) şi *hormonii adrenocorticali.*



Lanosterol Colesterol

Fig. 5.11. Sterolii: lanosterolul şi colesterolul

Colesterolul are un rol deosebit de important în membrana celulară. Sinteza colesterolului în organism trebuie strict reglementată, în vederea prevenirii asupra acumulării şi a depunerii anormale în organism. Depunerile de colesterol conduc la ateroscleroză, la boala arterelor coronariene. Sinteza normală a colesterolului în corpul adultului sănătos este de 1 g / zi şi consumul de 0,3 g / zi.

Nivelul normal al colesterolului în organism este de 150 – 200 mg / dl, care poate fi reglat, în parte, prin regimul alimentar.

Fiind un compus hidrofob, colesterolul nu-i solubil în sânge. Transportul său, ca şi al altor lipide, este asigurat de patru tipuri de lipoproteide plasmatice, grupate după densitatea lor în: lipoproteide cu densitate mare (high density proteins, HDL), de 1,21 – 1,63 g / cm^3; lipoproteide cu densitate mică (low density lipoproteins, LDL), de 1,063 – 1,006 g / cm^3; liproteide cu densitate foarte mică (very low density lipoproteins,VLDL), 1,006 – 0,96 g / cm^3 şi chilomicronii cu densitatea de 0,96 g / cm^3. În tabelul 5.2., sunt date câteva caracteristici ale lipoproteidelor plasmatice şi compoziţia lipidică a fiecăreia.

Lipoproteidele cu densitate mare (HDL), numite şi *colesterol bun*, descarcă arterele şi ţesuturile extrahepatice de colesterol şi îl aduce înapoi la ficat unde este degradat.

Lipoproteidele cu densitate mică (LDL), numite şi *colesterol rău*, transportă colesterolul de la locurile de secreţie la celulele organismului. Cantităţi importante de colesterol transportate de LDL conduc la formarea de depozite de colesterol pe pereţii arterelor, sub formă de plăci (aterom), care cresc riscul bolilor cardiovasculare.

Lipoproteidele cu densitate foarte mică (VLDL) sunt sintetizate în ficat şi reprezintă forma de transport a trigliceridelor sintetizate de acest organ spre ţesuturile extrahepatice. Cantităţi mici din aceste lipoproteide se formează şi în celulele intestinale.

Chilomicronii sunt lipoproteidele care se formează în perioada digestiei. Ele sunt responsabile de transportul lipidelor de la intestinul subţire la ţesuturi.

Tabelul. 4.2.

Caracteristici şi compoziţia lipidică a unor lipoproteide plasmatice

Lipoproteide	Concentraţia mg/100 ml	Mărimea Å	Lipide %	Proteine %	Fracţiuni lipidice %		
					Fosfolipide	Colesterol esterificat	Colesterol liber
HDL	330	100 – 170	55	45	45	30	8
LDL	350	200 – 290	84	16	27	41	10
VLDL	150	300 – 900	93	7	20	15	8
Chilomicroni	0 – 50	1 000 – 5 000	99	1	8	3	1

Acizii biliari. Fierea secretată de ficat conţine o serie de acizi amidificaţi cu glicina sau taurina, cu structură steroidă, denumiţi *acizi biliari conjugaţi*. *Acidul colic*, cel mai important acid biliar, combinat cu glicina sau cu taurina, poartă denumirea de *acid glicocolic* sau *acid taurocolic*:

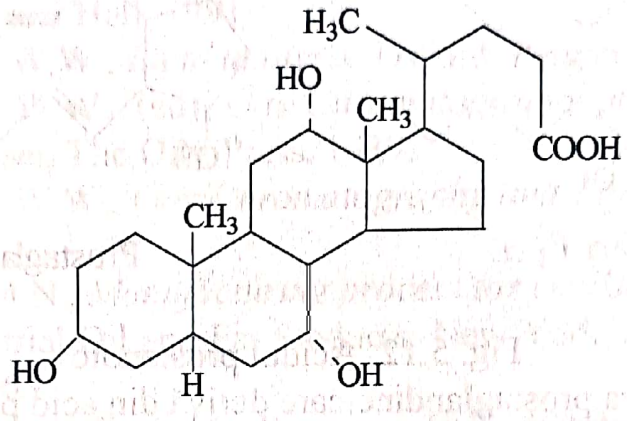
Acid glicocolic

Acid taurocolic

Aceşti acizi amidificaţi se găsesc în fiere sub forma sărurilor lor de sodiu. Prin hidroliză, rezultă acizii biliari propriu-zişi.

Principalii acizi biliari din fierea de om sunt:

Acidul colic	$C_{23}H_{39}O_3$— COOH
Acidul dezoxicolic	$C_{23}H_{39}O_2$ —COOH
Acidul litocolic	$C_{23}H_{39}O$ — COOH



Acid colic

În fierea de om şi a altor animale, se găsesc şi alţi acizi biliari ca acidul *desoxicolic, acidul chenodesoxicolic, acidul litocolic* etc.

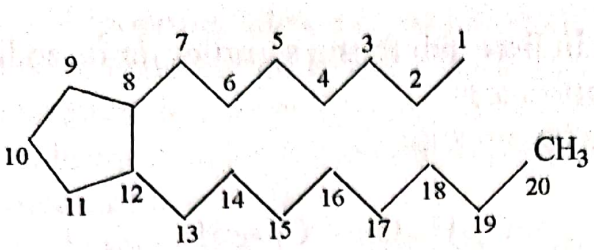
Acizii biliari amidificaţi, sub formă de sare de sodiu, au proprietatea de a solubiliza substanţe insolubile în apă, făcând posibilă trecerea lor prin mucoasa intestinală. Este cazul acizilor graşi proveniţi din grăsimi prin hidroliză, a unor gliceride nehidrolizate, β–carotina din hrană, vitamina K produsă de bacteriile intestinale etc.

5.3.3. PROSTAGLANDINELE

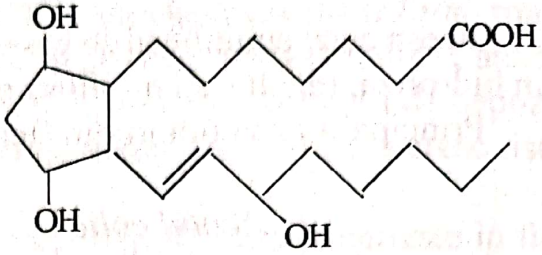
Prostaglandinele sunt derivaţi rezultaţi din ciclizarea acizilor graşi nesaturaţi cu 20 de atomi de carbon, ca acidul arahidonic, care, la rândul său, provine din acidul linoleic. Atomii de carbon 8 – 12 din catena acidului gras formează un ciclu de 5 atomi de carbon (fig. 5.12.) (1).

Prostaglandinele diferă între ele prin activitatea lor biologică. Toate produc, mai mult sau mai puţin, scăderea tensiunii sanguine şi induc contracţia muşchilor netezi.

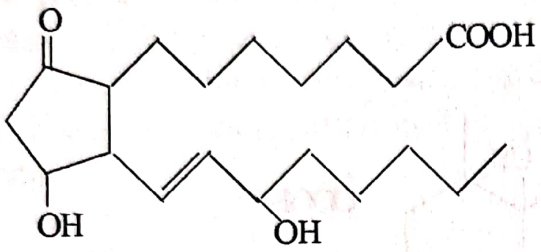
Scanned with OKEN Scanner



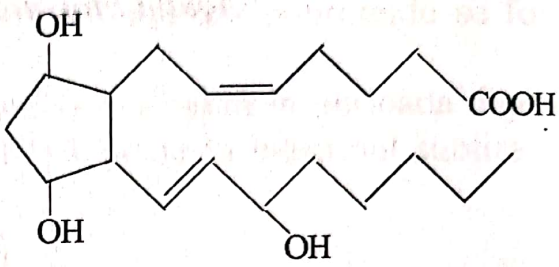
Acid prostanoic



Prostaglandina F_1



Prostaglandina $F_1 \alpha$



Prostaglandina $F_2 \alpha$

]

Fig. 5.12. Acidul prostanoic
şi câteva prostaglandine care derivă din acid prostanoic

Bibliografie selectivă:

1. Lehninger, A.L., *Biochimie*, vol. I şi II, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, 1992.

2. Nenițescu, C.D., *Chimie Organică*, vol. I şi II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.

3. Chiriță, A., *Produse Auxiliare şi Coloranți*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1988.

4. Raven, P.H., Johnson, G.B., *Biology*, 3rd edition, Wm.C. Brown publ. Dubuque, Iawa, 1995.

5. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., *Microbiology An Introduction*, 5th Edition, The Benjamin / Cummings Publishing Co.Inc. Redwood City C.A., 1995.

6. Mathews, C.K.m, van Holde, K.E., *Biochemistry*, The Benjamin / Cummings Publishing Co.Inc., Redwood City C.A., 1990.

7. Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., *A comprehensive classification system for lipids*, J. Lipid Res., 2 005, 46(5), pp. 839 – 861.

8. Vance, J.E., Vance, D.E., *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Elsevier, Amsterdam, 2 002.

Scanned with OKEN Scanner

9. Bach, D., Wachtel, E., *Phospholipid / cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites*, Biochim. Biophys. Acta, 2 003, 1610, pp. 187 – 197.

10. Heinz, E, *Plant glycolipids: structure, isolation and analysis. In Advances in Lipid Methodology*, ed. W.W. Christie, Oily Press, Dundee, 1996.

11. Hölzl, G., Dörmann, P., *Structure anf function of glycoglycerolipids in plants and bacteria*, Prog. Lipid Res., 2 007, 46, pp. 225 – 243.

12. Gurr, M.I., Harwood, J.L., *Lipid Biochemistry, An Introduction*, London, Chapman and Hall, 1991.

13. Christie, W.W., *Lipid analysis*, Oxford, Pergamon Books, 1982.

14. Christie, W.W., (ed), *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*, Somerset, The Oily Press, 1989.

15. Christie, W.W., *Gas Chromatography and Lipids*, Somerset, The Oily Press, 1990.

16. Gupta, M.N., *Manufacturing process for emulsifiers*, in Hui Y.H., ed., Bailey's Industrial Oil and Fat Products, New York, John Wiley, vol. 4, pp. 569 – 601, 1996.

17. Van Damme, E. J. M., Peumans, W.J., Pusztai, A., Bardocz, S., (eds), *Handbook of Plant Lecitins: Properties and Biomedical Applications*, Chichester, John Wiley and Sons, 1998.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6

ENZIME

6.1. Caracteristici generale 198
6.2. Activitatea catalitică a enzimelor 201
6.3. Cinetica reacțiilor catalizate enzimatic 204
6.3.1. Efectul concentrației de substrat asupra activității enzimatice 206
6.3.2. Efectul temperaturii asupra activității enzimatice 208
6.3.3. Efectul pH-ului asupra activității enzimatice 209
6.3.4. Influența activatorilor și a inhibitorilor asupra activității enzimatice 209
6.4. Specificitatea catalizei enzimatice 212
6.5. Enzime proteolitice 213
6.5.1. Enzime proteolitice ale vertebratelor 214
6.5.2. Enzime proteolitice ale sângelui 220
6.5.3. Enzime proteolitice de origine vegetală 221
6.5.4. Enzime proteolitice microbiene și fungice 222

Bibliografie *224*

6.1. CARACTERISTICI GENERALE

Enzimele sunt proteine care au funcția de catalizatori ai reacțiilor biologice. Ele au rol fundamental în reglarea proceselor metabolice, deoarece numai datorită acțiunii lor, sunt posibile transformările chimice în organismele vii. Cu toate că enzimele sunt produse numai de către organismele vii, acestea își pot exercita acțiunea și în afara organismelor.

Scanned with OKEN Scanner

În organismele vii, se petrec, cu o uimitoare uşurinţă, la temperatura şi pH-ul fiziologice, un număr mare de reacţii, pe care chimistul nu le-ar putea efectua în laborator decât lucrând la temperaturi şi presiuni ridicate, în prezenţa acizilor sau bazelor tari, a dizolvanţilor neapoşi sau a catalizatorilor heterogeni anorganici. Printre aceste reacţii, sunt degradări de molecule prin hidroliză sau oxidare, precum şi sinteza de noi compuşi cu structură complicată.

Reacţii enzimatice au fost folosite din timpuri străvechi pentru producerea vinului, oţetului, berii şi a brânzei, dar abia în anul 1877, a fost utilizată denumirea de *enzimă* pentru substanţa din drojdia de bere cu rol de catalizator biologic, care produce „fermentaţia" zahărului cu formare de alcool. În anii 1930 – 1936, J. Northrop a cristalizat enzimele: pepsină, tripsină şi chimotripsină şi s-a dovedit că enzimele sunt proteine.

În prezent, se cunosc circa 2 000 enzime, dintre care multe au fost izolate în stare pură şi altele au fost cristalizate.

În organismele vii, enzimele se găsesc în celule, ţesuturi, organe şi, mai ales, în organele cu rol important în metabolism, cum sunt ficatul, splina, tubul digestiv. În celule, repartiţia enzimelor este diferită în diversele formaţiuni celulare. Astfel, în lizozomi, sunt cele mai mari cantităţi de enzime, apoi în mitocondrii şi microzomi.

Deşi majoritatea enzimelor implicate în procesele metabolice ale celulei au fost identificate, trebuie elucidat controlul genetic al sintezei enzimelor, mecanismele moleculare de reglare a activităţii enzimatice, cum reuşesc enzimele să catalizeze reacţiile chimice cu o astfel de eficienţă, precizie şi specificitate.

Enzimele care activează în interiorul celulelor se numesc *endoenzime* sau *enzime intracelulare*, iar cele care activează în lichidele extracelulare se numesc *exoenzime* (enzime salivare, din stomac, pancreas, intestin etc.).

Pentru denumirea enzimelor, la multe dintre ele, s-a adăugat *substratului* sufixul *„-ază"*, adică compusului asupra căreia enzima îşi manifestă acţiunea de cataliză. Astfel, *tirozinaza* catalizează hidroliza tirozinei, *carboxipeptidaza* catalizează hidroliza legăturii C-terminale din peptide, *carboxiesteraza* hidrolizează esterii diferiţilor acizi carboxilici etc. Nu întotdeauna, însă, s-a respectat această regulă, unele enzime primind denumiri chimice nesugestive ca: pepsina, tripsina, chimotripsina, catalaza. *Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (*NC – IUBMB*), pentru a veni în întâmpinarea reglementării nomenclaturii enzimelor, domeniu care cunoaşte o dezvoltare rapidă în ştiinţă şi practică, recomandă nomenclatura şi clasificarea enzimelor după reacţiile lor în cataliză. Nomenclatura enzimelor după NC–IUBMB împarte enzimele în şase clase: *oxido-reductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze şi ligaze*

Scanned with OKEN Scanner

(tabelul 6.1.) şi în grupe de subclase, după tipul de reacţie catalizată. Fiecare enzimă are o denumire comună, potrivită cu folosirea curentă, o denumire sistematică care indică tipul de reacţie catalizată şi un număr de clasificare pentru identificarea corectă a unei enzime. Un exemplu de reacţie de cataliză enzimatică:

O aldehidă aromatică + O_2 + H_2O = Un acid carboxilic aromatic + H_2O_2

Denumirea comună a enzimei respective este: aril-aldehid oxidaza. Denumirea sistematică a reacţiei catalizate este: aril-aldehid: oxigen oxido-reductaza. Numărul său de clasificare este EC 1, 2, 3, 9, unde EC este prescurtarea de la „Enzyme Commission", cifra 1 se referă la prima clasă de enzime, (oxido-reductaze), cifra 2 indică subclasa de oxigen oxidoreductaze, cifra 3 indică sub-subclasa şi cifra 9 indică numele comun, aril-aldehid oxidaza.

Tabelul 6.1.

Clasificarea internaţională a enzimelor, cu indicarea claselor, a numerelor de cod şi a tipurilor de reacţii catalizate

1. *Oxido-reductaze* (reacţii de oxido-reducere)	2. *Transferaze* (transferă grupări funcţionale)
1.1. Acţionează asupra $\overset{\vert}{CH}-OH$	2.1. Grupări cu un carbon
1.2. Acţionează asupra $\overset{\vert}{C}=O$	2.2. Grupări aldehidă sau cetonă
1.3. Acţionează asupra $\overset{\vert}{C}=CH-$	2.3. Grupări acil
1.4. Acţionează asupra $\overset{\vert}{CH}-NH_2$	2.4. Grupări glicozil
1.5. Acţionează asupra $\overset{\vert}{C}-NH-$	2.5. Grupări fosfat
1.6. Acţionează asupra NADH, NADPH	2.6. Grupări conţinând S
3. *Hidrolaze* (reacţii de hidroliză)	4. *Liaze* (adiţie la dubla legătură)
3.1. Esteri	4.1. $\overset{\vert}{C}=\overset{\vert}{C}$
3.2. Legături glicozidice	
3.4. Legături peptidice	

3.5. Alte grupări C – N
3.6. Anhidride acide

4.2. $C=O$

4.3. $C=N-$

5. *Izomeraze* (reacţii de izomerizare)

5.1. Racemaze

6. *Ligaze* (formare de legături cu scindare de ATP)

6.1. C – O
6.2. C – S
6.3. C – N
6.4. C – C

6.2. ACTIVITATEA CATALITICĂ A ENZIMELOR

Activitatea unor enzime depinde numai de structura lor ca proteine, în timp ce altele au nevoie de una sau mai multe substanţe neproteice, numite *cofactori*. Cofactorul poate fi un ion metalic sau o moleculă organică neproteică numită *coenzimă*. Reacţiile la care participă coenzimele sunt reacţii de transfer (de electroni, de protoni, de grupe fosfat etc.). Se disting *coenzime activatoare* sau *grupe prostetice*, care sunt puternic legate de apoenzimă prin legături covalente, care nu se detaşează de *apoenzimă* în cursul reacţiei şi *coenzime transportoare* sau *cosubstrate*, care se disociază uşor de apoenzimă. Complexul enzimă – cofactor, care are acţiune catalitică, poartă numele de *holoenzimă* (enzimă completă). La îndepărtarea cofactorului, enzima este catalitic inactivă şi poartă numele de *apoenzimă*.

Apoenzima determină specificitatea de substrat (substanţa asupra căreia acţionează enzima) şi de acţiune, decizând care anume dintre numeroasele posibilităţi de transformare ale substratului va fi urmată. Acest fapt este evidenţiat în cazurile în care acelaşi cofactor enzimatic poate cataliza reacţii diferite.

O anumită apoenzimă poate reacţiona cu anumite coenzime şi se produce cataliza numai a anumitor reacţii specifice. Această specificitate este determinată de structura apoenzimei care activează grupările prostetice şi mediază legarea enzimei de substrat.

În molecula enzimei, se află *un centru activ*, prin intermediul căruia se realizează un complex enzimă – substrat şi are loc procesul catalitic. În ca-

Scanned with OKEN Scanner

zul enzimelor proteidice, din structura centrului activ face parte şi cofactorul enzimatic.

Enzimele sunt compuşi macromoleculari, se inactivează prin încălzire în aceleaşi condiţii în care sunt denaturate proteinele. Acei reactivi care denaturează proteinele, inactivează, fără excepţie, enzimele. Uneori, inactivarea însoţită de denaturarea enzimelor este reversibilă.

Solubilitatea enzimelor este asemănătoare cu a globulinelor.

Enzimele, ca toţi catalizatorii, nu catalizează decât reacţiile termodinamic posibile, decurgând în sensul stabilirii unui echilibru.

Capacitatea de reacţie a substanţelor poate fi mărită prin activarea lor, de exemplu, prin încălzire. Asemenea substanţe pot reacţiona numai după aportul unei anumite cantităţi de energie, numită *energie de activare*. Chimia dispune de o modalitate de reducere a energiei de activare, respectiv, de accelerare a vitezelor reacţiilor prin adaosuri de substanţe, în cantităţi foarte mici, numite *catalizatori*, care favorizează desfăşurarea reacţiilor, coborând energia de activare.

Când o reacţie poate fi catalizată atât de o enzimă, cât şi de catalizatori anorganici, se constată că reacţia enzimatică decurge cu viteză mult mai mare. Rezultă că reacţia enzimatică are o energie de activare mult mai mică.

Considerând că o substanţă A se poate transforma într-o altă substanţă B, mai săracă în energie şi reacţia poate fi activată de catalizatori anorganici sau de enzime, energia de activare în cazul catalizatorilor anorganici este mult mai mare decât în cazul în care se desfăşoară sub acţiunea enzimelor. Acest fapt este redat în figura 6.1.

Enzimele micşorează energia de activare şi prin aceasta măresc viteza reacţiilor chimice. Reducerea energiei de activare se realizează prin formarea între enzimă şi substrat a unuia sau mai multor complecşi labili enzimă – substrat:

$$\underset{E}{\text{Enzimă}} + \underset{S}{\text{Substrat}} \leftrightarrow \underset{ES}{\text{Enzimă – Substrat}}$$

Complexul ES reacţionează cu viteză mare cu un reactant X, dând produsul sau produşii de reacţie, regenerând enzima:

$$\text{Enzimă – Substrat} + X \rightarrow \text{Enzimă} + \text{Produs de reacţie (P)}$$

Succesiunea aceasta de reacţii este mult mai amplă, rezultând nu numai unul, ci mai mulţi complecşi.

Scanned with OKEN Scanner

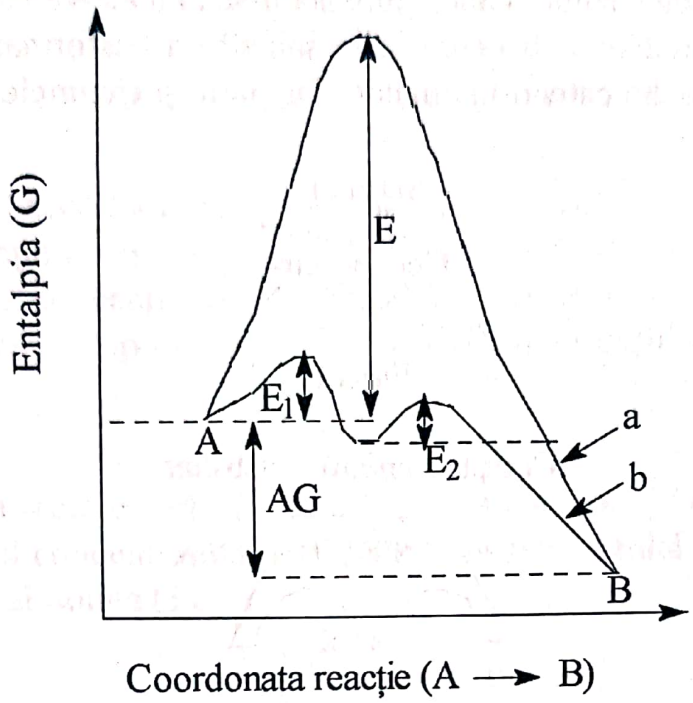


Fig. 6.1. Variația entalpiei în cursul unei reacții

a. neenzimatică; b. enzimatică; E. energia de activare în reactia neenzimatică; E_1. energia de activare în formarea complexului enzimă–substrat A; E_2. energia eliberată la descompunerea complexului enzimă–substrat A în substanța B

Centrul activ al enzimei trebuie să ofere un acces steric perfect, care să se potrivească formei moleculei substratului. Aceasta este aşa-numita ipoteză „cheie–broască“ sau „mână–mănuşă“.

Între substrat şi centrul activ al enzimei, se formează legături reversibile: legături covalente reversibile, electrovalente, de hidrogen, van der Waals. Majoritatea substratelor se leagă de enzimă prin două sau mai multe puncte. O schemă a acțiunii enzimelor este dată în figura 6.2.

Reacția prezentată reprezintă o scindare. Enzima este reprezentată ca o proteină liniară, fiind arătată numai porțiunea care conține centrul său activ. Substratul este atras din soluție de centrul activ prin grupele sale reactive. Substratul este fixat la centrul activ al enzimei şi are loc catalizarea reacției, după care moleculele produsului (P) nou format părăsesc enzima care devine liberă pentru o altă captare şi cataliză. În structura substratului, pot apărea variații, ca urmare a unor reacții chimice cu alți compuşi. Aceste reacții nu vor împiedica reacția enzimatică dacă nu se produc în zona în care centrul activ al enzimei vine în contact cu substratul.

Scanned with OKEN Scanner

Activitatea enzimelor nu durează indefinit. În timp, cantitatea de substrat transformată de enzime scade, ajungându-se la inactivarea lor. Inactivarea se explică datorită denaturării enzimelor sau altor transformări specifice proteinelor globulare din categoria din care fac parte şi enzimele.

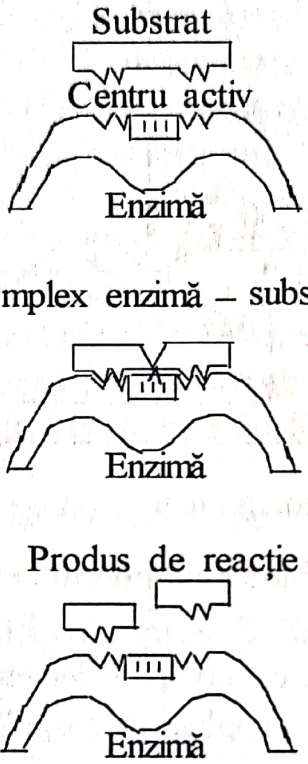


Fig. 6.2. Diagrama de acţiune a enzimei

6.3. CINETICA REACŢIILOR CATALIZATE ENZIMATIC

Pe baze cinetice, reacţiile chimice pot fi clasificate prin ordinul de reacţie: reacţii de ordinul zero, întâi, doi şi trei, în funcţie de modul cum viteza de reacţie este influenţată de concentraţia reactanţilor în condiţiile date.

O serie de reacţii enzimatice sunt de ordinul zero, în raport cu reactanţii. Viteza de reacţie depinde de concentraţia catalizatorului sau de un alt factor, altul decât concentraţia reactanţilor.

Reacţiile de ordinul întâi se desfăşoară cu o viteză direct proporţională cu concentraţia unuia dintre reactanţi. Un exemplu simplu este cazul în care viteza de reacţie este direct proporţională cu concentraţia molară a lui A:

$$A \leftrightarrow P$$

Scanned with OKEN Scanner

Viteza de reacţie în orice moment *t* este dată de o ecuaţie de viteză de ordinul întâi:

$$\frac{-d\,[A]}{dt} = k\,[A]$$

unde [A] este concentraţia molară a lui A, iar – d[A] / dt este viteza cu care scade concentraţia lui A. Constanta de proporţionalitate k este constanta de viteză sau viteza de reacţie specifică (1). La reacţiile de ordinul al doilea, viteza de reacţie este proporţională cu produsul concentraţiilor a doi reactanţi:

$$A + B \rightarrow P$$

Viteza de reacţie, –d[A] / dt, –d[B] / dt sau +d[P] / dt este proporţională cu produsul concentraţiilor lui A şi B, aşa cum rezultă din ecuaţia de viteză de ordinul al doilea (1):

$$\frac{-d\,[A]}{dt} = k\,[A][B]$$

unde k este constanta de viteză de ordinul al doilea.

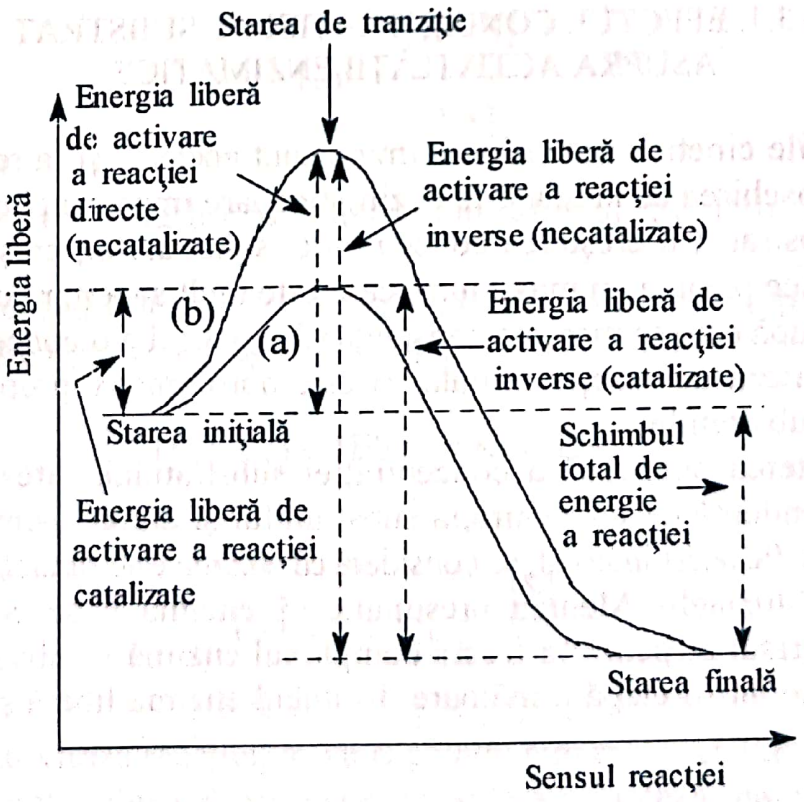


Fig. 6.3. Variaţia energiei libere
în timpul unei reacţii catalizate (a) şi necatalizate (b)

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia de ordinul doi, A+ B = P, în anumite condiţii, poate fi de ordinul întâi. De exemplu, dacă concentraţia lui A este foarte mare şi a lui B foarte mică, viteza de reacţie este, practic, proporţională cu concentraţia unui singur reactant, a lui B. La reacţiile de ordinul trei, relativ rare, viteza de reacţie este proporţională cu produsul a trei factori de concentraţie. Vitezele de reacţie pot fi şi de ordin mixt.

O reacţie chimică, A↔P are loc, deoarece o parte din moleculele A au energia necesară de a ajunge la o stare activată, numită *stare de tranziţie*, când este posibil să se formeze o legătură chimică sau să se distrugă, formându-se produsul P (fig. 6.3.).

Viteza unei reacţii chimice este proporţională cu concentraţia substanţelor aflate în starea de tranziţie. Energia liberă de activare ΔG este cantitatea de energie necesară pentru a aduce un mol de substanţă, la o anumită temperatură, în starea de tranziţie. Viteza reacţiei chimice poate fi accelerată prin creşterea temperaturii sau prin adăugarea de catalizatori. Catalizatorii se combină pentru scurt timp cu reactanţii, aducându-i la starea de tranziţie cu o cantitate de energie de activare mai mică decât în absenţa catalizatorilor. O dată cu formarea produşilor de reacţie, catalizatorul este eliberat (fig. 6.3.).

6.3.1. EFECTUL CONCENTRAŢIEI DE SUBSTRAT ASUPRA ACTIVITĂŢII ENZIMATICE

Principiile cineticii reacţiilor chimice sunt aceleaşi şi la reacţiile enzimatice, cu deosebirea că la reacţiile enzimatice, are importanţă deosebită saturarea cu substrat. Cu creşterea concentraţiei substratului, creşte viteza reacţiei enzimatice până la un maximum (care este mult superior concentraţiilor fiziologice), după care se menţine constantă (fig. 6.4.). La o concentraţie mică de substrat, viteza de reacţie iniţială v_0 este aproximativ proporţională cu concentraţia substratului.

Cu creşterea puternică a concentraţiei substratului, viteza de reacţie devine independentă de concentraţia substratului şi atinge asimptotic o valoare constantă. Pe acest interval, se consideră că enzima este saturată de substrat.

Teoria Michaelis–Menten presupune că enzima E se combină, mai întâi, cu substratul S, pentru a forma complexul enzimă – substrat, ES, care se descompune într-o etapă următoare, formând enzima liberă şi produsul P (fig. 6.2.):

$$E + S \leftrightarrow ES \qquad (1)$$

Scanned with OKEN Scanner

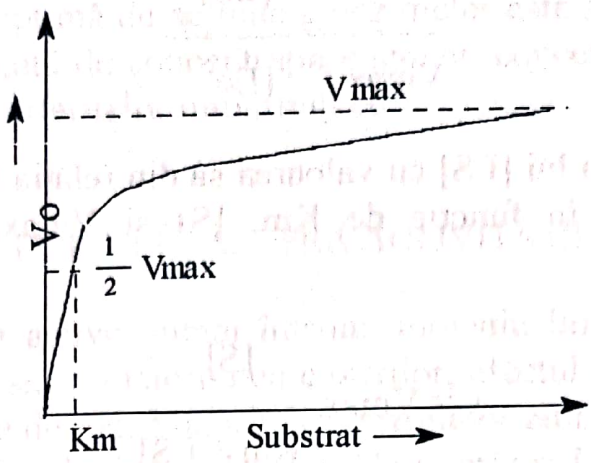


Fig. 6.4. Influența concentrației substratului asupra vitezei unei reacții catalizate enzimatic

$$ES \leftrightarrow E + P \qquad (2)$$

Aplicând legea acțiunii maselor la reacția dintre enzimă și substrat (1), se poate scrie:

$$Km = \frac{[E]\,[S]}{[ES]} \qquad (3)$$

unde Km = constanta lui Michaelis, indicator al afinității enzimei pentru substrat.

Introducând valoarea concentrației totale a enzimei Eo și a concentrației enzimei libere [Eo] – [E], se obține relația:

$$[S]\{[Eo] - [ES]\} = Km\,[ES] \qquad (4)$$

de unde,

$$[ES] = [Eo]\,\frac{[S]}{Km + [S]}$$

Întrucât viteza reacției, v, va fi cu atât mai mare, cu cât va fi mai mare valoarea complexului ES, se poate considera că viteza maximă de reacție, notată cu Vmax, va fi în momentul în care toată enzima se va afla legată în Es, ceea ce face posibilă relația:

Scanned with OKEN Scanner

$$\frac{v}{Vmax} = \frac{[ES]}{[Eo} \qquad (5)$$

Prin înlocuirea lui [ES] cu valoarea sa din relația (4), rezultă valoarea vitezei de reacție, în funcție de Km, [S] şi Vmax, care este ecuația Michaelis– Menten:

$$v = Vmax \frac{[S]}{Km + [S]} \qquad (6)$$

Constanta Michaelis–Menten (Km) este o măsură a afinității enzimei pentru substratul asupra căruia acționează. O valoare ridicată a acestei constante indică faptul că enzima manifestă o mică afinitate pentru substratul asupra căruia acționează şi presupune că această enzimă catalizează modificări biochimice ale unor substanțe cu structuri chimice asemănătoare. O valoare mică a lui Km arată o înaltă afinitate a enzimei pentru substrat şi presupune o strictă specificitate de substrat.

6.3.2. EFECTUL TEMPERATURII ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Ca şi în cazul reacțiilor chimice, viteza reacțiilor catalizate de enzime creşte cu temperatura în intervalul în care enzimele îşi păstrează stabilitatea. Viteza de reacție a enzimelor, la o creştere a temperaturii cu 10°C, se măreşte cu un coeficient de 1,5 – 3,0. Cele mai multe enzime au activitate optimă la temperatura fiziologică, în jur de 37°C. Enzimele fiind proteine, cu creşterea temperaturii, suferă un proces de denaturare, care scade activitatea enzimatică, ajungând la inactivitate, iar denaturarea este obişnuit ireversibilă. Majoritatea enzimelor sunt inactivate la 55 – 60°C. Unele enzime, ca ribonucleaza, devin inactive prin încălzire, dar îşi recapătă activitatea prin răcire. Enzimele unor bacterii termofile, care trăiesc în apa izvoarelor termale, îşi păstrează activitatea la temperaturi de peste 90°C. Papaina, de asemenea, rezistă la temperaturi mai ridicate de 60°C, cu condiția ca valoarea pH-ului să fie mai mare de 4, deoarece altfel se denaturează ireversibil.

La temperaturi mai scăzute decât temperatura optimă, activitatea enzimatică scade, enzimele devin inactive, dar la ridicarea temperaturii, activitatea enzimatică revine la normal. Aşa se explică rezistența la ger a semințelor, care sunt, apoi, capabile să germineze.

Scanned with OKEN Scanner

Temperatura optimă de acţiune a enzimelor este specifică fiecărei enzime şi este influenţată de concentraţia enzimei, concentraţia ionilor de hidrogen, de prezenţa diferitelor impurităţi etc.

6.3.3. EFECTUL PH-ULUI ASUPRA ACTIVITĂŢII ENZIMATICE

Enzimele sunt active numai într-un domeniu limitat al concentraţiei ionilor de hidrogen şi, în majoritatea cazurilor, efectul catalitic este maxim la o anumită valoare de pH. Majoritatea enzimelor au o activitate optimă în vecinătatea valorii fiziologice a pH-ului. Un număr redus de enzime fac excepţie de la această regulă. Astfel, pepsina este activă la pH = 1–4, cu un maximum de activitate la pH = 1,8. Câteva enzime au o activitate catalitică maximă în mediu alcalin. Argininaza, în prezenţa Mn^{2+}, are acţiune optimă la pH = 10. Valoarea optimă de pH a argininazei este influenţată de natura chimică a ionului metalic activator. De asemenea, aceeaşi enzimă din seminţele de *Phaseolum vulgaris*, parţial purificată, prezintă două valori optime de activitate la pH = 7,3 şi pH = 8,7.

Relaţia dintre pH şi activitate, pentru orice enzimă, este în funcţie de comportarea sa şi a substratului la acizi şi baze, care influenţează stabilitatea enzimei, afinitatea sa pentru substrat, viteza reacţiei enzimatice.

Pentru multe enzime, curba pH – activitate are formă de clopot, dar ea poate varia considerabil la unele enzime mai ales în funcţie de concentraţia substratului, deoarece, în aceste cazuri, Km se modifică cu pH-ul.

6.3.4. INFLUENŢA ACTIVATORILOR ŞI A INHIBITORILOR ASUPRA ACTIVITĂŢII ENZIMATICE

Activatorii se pot delimita greu de coenzime. Aceştia sunt substanţe de natură anorganică sau organică, care accelerează reacţiile enzimatice. Pot îndeplini rolul de activatori mulţi anioni, cum sunt: Cl^-, NO_3^-, PO_4^{3-} etc. şi cationi ca: Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Ca^{2+} etc., precum şi o serie de compuşi organici cu masă moleculară mică, cum sunt: esterii fosforici, glutationul, cisteina etc.

Unii activatori au rolul de a proteja enzima împotriva unor factori de denaturare sau de inactivare, iar alţii, de a face substratul apt pentru atacul enzimei.

Scanned with OKEN Scanner

Ionii metalici determină o activare specifică a enzimelor şi îndeplinesc atât un rol funcţional, cât şi un rol structural în cataliza enzimatică, întrucât ei constituie o parte esenţială a centrului activ al enzimei.

Ionii metalici participă întotdeauna la uşurarea formării complexului enzimă – substrat, precum şi la formarea de complecşi cu produsul rezultat din reacţie, îndepărtându-l în acest fel din sistem.

Inhibitorii sunt substanţe cu moleculă mică care se leagă de enzimă prin legături necovalente şi care, introduşi în amestecul de reacţie, provoacă scăderea vitezei reacţiei enzimatice sau o opresc. Inhibitorii se pot clasifica, în funcţie de mecanismul lor de acţiune, în *inhibitori reversibili* şi *inhibitori ireversibili.*

O categorie aparte de inhibitori sunt inhibitorii ireversibili, care se leagă, de cele mai multe ori, printr-o legătură covalentă de un aminoacid din constituţia enzimei, esenţial pentru activitatea sa biologică, formând un compus stabil şi inactiv. Astfel, prin tratarea cu iodacetat la pH = 5,5, ribonucleaza suferă o alchilare la două resturi de histidină din centrul său activ şi îşi pierde activitatea catalitică. Un alt exemplu, este acţiunea agentului de fosforilare *diizopropilfluorofosfatul* asupra unor enzime ca: *acetilcoliesteraza, chimo-tripsina, tripsina, fosfoglucomutaza* şi unele *esteraze,* cu obţinerea unor derivaţi inactivi, în care gruparea hidroxil a unui rest specific de serină este fosforilată.

Inhibitorii reversibili, după modul lor de acţiune, produc trei tipuri mai importante de inhibiţie enzimatică: *competitivă, incompetitivă* şi *necompetitivă,* după efectele inhibitorului asupra cineticii de reacţie a enzimei şi care pot fi analizate cu ajutorul ecuaţiei fundamentale de viteză, Michaelis – Menten. Enzima inhibată poate avea o valoare *Km* crescută (*inhibiţia competitivă),* o valoare *Vmax* redusă (*inhibiţia necompetitivă), Vmax* şi *Km* reduse într-un raport constant *(inhibiţia incompetitivă)* sau o combinaţie a acestor efecte *(inhibiţia mixtă).*

J. Botts şi M. Morales au prezentat o schemă generală cuprinzând unele tipuri de inhibiţie (fig. 6.5.).

În schema din figura 6.5., sunt patru specii moleculare: enzima liberă, E, complexul enzimă – substrat, ES, complexul enzimă – inhibitor, EI, complexul enzimă – inhibitor – substrat, EIS şi şase căi de reacţie între ele (5).

La inhibiţia competitivă, inhibitorul se poate combina cu enzima liberă, astfel că el concurează cu substratul pentru legarea de centrul activ.

Scanned with OKEN Scanner

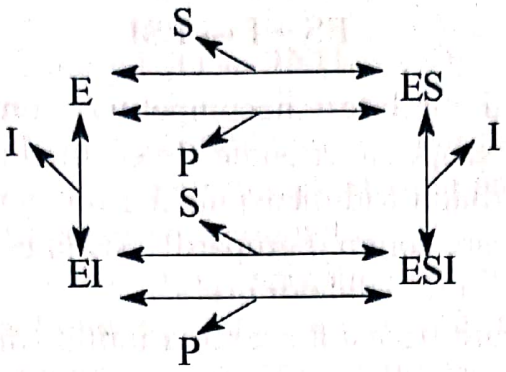


Fig. 6.5. Schemă general cuprinzând
diferitele tipuri de inhibiție (J. Botts, M. Morales)

Un inhibitor competitiv reacționează reversibil cu enzima pentru a forma un complex *enzimă – inhibitor (EI)* analog cu complexul enzimă–substrat:

$$E + I \leftrightarrow EI$$

Inhibiția competitivă este ușor de recunoscut pe cale experimentală, deoarece procentul de inhibiție la o concentrație fixă de inhibitor scade o dată cu creșterea concentrației substratului.

Un exemplu de inhibiție competitivă este a succinat dehidrogenazei de către inhibitorul malonat întâlnit la ciclul acidului tricarboxilic (cap. 8, acizii aminici), ca și anionii altor acizi dibazici.

La inhibiția incompetitivă, inhibitorul nu se combină cu enzima liberă și nu afectează reacția acesteia cu substratul. În acest caz, inhibitorul se combină cu complexul enzimă – substrat și formează un complex inactiv enzimă – substrat – inhibitor, care nu mai poate conduce la o reacție ulterioară, de formare a produsului obișnuit:

$$ES + I \leftrightarrow ESI$$

La inhibiția incompetitivă, gradul de inhibiție crește când concentrația substratului crește.

La inhibiția necompetitivă, un inhibitor necompetitiv se poate combina cu enzima liberă sau cu complexul enzimă – substrat. Inhibitorii necompetitivi se leagă de enzimă în alt loc decât în centrul activ, producându-se, adesea, modificări ale enzimei, ceea ce conduce la încetinirea formării complexului enzimă – substrat, iar complexul enzimă – substrat se descompune mai lent la formarea produșilor de reacție. Reacția inhibitorului la inhibiția necompetitivă duce la două forme inactive, EI și ESI:

Scanned with OKEN Scanner

$$E + I \leftrightarrow EI$$
$$ES + I \leftrightarrow ESI$$

Cei mai comuni inhibitori necompetitivi sunt reactivii care se pot combina reversibil cu grupe funcţionale ale enzimei din afara centrului activ şi care menţin conformaţia tridimensională a moleculei de enzimă catalitic activă. Unele enzime care conţin o grupare – SH în centrul activ sunt inhibate necompetitiv de către ionii metalelor grele.

Unele enzime care necesită prezenţa ionilor metalici în centrul activ, pentru activitatea lor, pot fi inhibate necompetitiv de către agenţii care sunt capabili să lege reversibil aceşti ioni. Astfel, este cazul *etilendiaminotetraacetatul (EDTA)* care leagă reversibil ionii Mg^{2+}, ca şi alţi cationi divalenţi.

6.4. SPECIFICITATEA CATALIZEI ENZIMATICE

Fiecare enzimă catalizează un anumit tip de reacţie posibilă din punct de vedere termodinamic, deci are o anumită *specificitate de acţiune*. Specificitatea de acţiune, o caracteristică esenţială a enzimelor, este conferită de partea proteică a enzimelor (apoenzima), partea prostetică având un rol secundar.

Majoritatea enzimelor acţionează asupra unui anumit substrat şi, mai rar, asupra unui număr de substanţe înrudite structural cu acesta, deci posedă o înaltă *specificitate de substrat*. Specificitatea de substrat a enzimelor este un fenomen de mare însemnătate biologică, care stă la baza metabolismului. Gradul specificităţii enzimelor este diferit de la o enzimă la alta, în funcţie de natura lor şi de mecanismul reacţiei la care participă. În funcţie de specificitatea lor de substrat, enzimele pot fi grupate în patru categorii distincte: cu *specificitate absolută, specificitate absolută de grup, specificitate relativă de grup* şi cu *specificitate stereochimică.* Clasificarea aceasta este doar convenţională, deoarece nu se poate face o delimitare absolută. Unele enzime catalizează reacţia principală, dar manifestă şi specificităţi de acţiune secundare, catalizând reacţii enzimatice diferite.

Specificitatea absolută. Unele enzime acţionează asupra unui singur substrat cu o anumită structură chimică, catalizează o singură reacţie şi sunt inactive faţă de alte substanţe înrudite structural. Astfel, hidroliza ureei la CO_2 şi NH_3 este catalizată de urează (5):

Scanned with OKEN Scanner

$$\text{Uree} + H_2O \rightarrow 2NH_3 + CO_2$$

Enzimele cu specificitate absolută se pot fixa prin centrul lor activ la substanţe înrudite cu substratul, pentru care enzima are specificitate absolută, acţionând ca inhibitori enzimatici competitivi.

Specificitatea absolută de grup. Specificitatea absolută de grup se manifestă la enzima care acţionează asupra unui număr mic de substanţe înrudite structural. Astfel, arginaza catalizează reacţia care are loc în ciclul ureogenic:

$$\text{L–arginină} + H_2O \leftrightarrow \text{L–ornitină} + \text{uree}$$

Specificitatea relativă de grup. Enzimele cu specificitate relativă de grup acţionează asupra anumitor legături chimice existente în substrat şi nu ţin cont de restul structurii chimice a substratului.

Lipaza hidrolizează numai substraturi emulsionate (un număr mare de esteri ai glicerinei şi ai altor alcooli cu acizii graşi, cu catenă lungă).

Fosfomonoesterazele hidrolizează o mare varietate de monoesteri ai acidului ortofosforic. Pirofosfat fosfohidrolaza catalizează, în mediu alcalin, scindarea hidrolitică a pirofosfatului anorganic, unii tri-, tetra- şi polifosfaţi în prezenţa Mg^{2+}, a unor pirofosfaţi organici de tipul ATP, ITP, TPP, Nad în prezenţa Zn^{2+} sau Mn^{2+}.

Specificitatea stereochimică. Stereospecificitatea conferă enzimelor proprietatea de a recunoaşte substraturi care conţin centri asimetrici şi de a reacţiona numai asupra unuia dintre izomerii optici. În cele mai multe cazuri, specificitatea optică este absolută. Într-un mediu de reacţie în care este prezent un amestic racemic, enzima reacţionează numai asupra unui singur izomer.

6.5. ENZIME PROTEOLITICE

Dintre enzimele proteolitice, se vor trata, mai ales, acelea care sunt prezente în organismul vertebratelor.

Enzimele proteolitice au o importanţă fiziologică deosebită. Principala reacţie catalizată de acestea este hidroliza legăturii peptidice, amidice şi esterice din moleculele proteice, dar şi cataliza unor reacţii de esterificare, transesterificare etc. Ele se găsesc în tractul gastrointestinal, dar şi în ficat, splină, rinichi, glandele endocrine, creier, unele ţesuturi şi fluide corporale. Unele se găsesc în plante şi microorganisme.

Scanned with OKEN Scanner

6.5.1. ENZIME PROTEOLITICE ALE VERTEBRATELOR

Organismul animal asimilează numai acizi aminici liberi, nu şi peptide sau proteine. Hidroliza completă a unei proteine până la aminoacizi are loc numai prin cooperarea mai multor enzime. Se disting două grupe mari de enzime proteolitice: *proteinazele* care hidrolizează proteinele native până la peptide mari (pepsina, tripsina, chimotripsina) şi *peptidazele,* care hidrolizează peptidele până la aminoacizi (*carboxipeptidaze, aminopeptidaze, dipeptidaze).* Pe baza cercetării specificităţii enzimelor, s-a constatat că pepsina şi tripsina nu hidrolizează numai proteinele native, ci şi peptide mici, dacă acestea conţin anumiţi aminoacizi. Max Bergmann a ajuns la concluzia că enzimele proteolitice sunt peptidaze. De aceea, enzimele proteolitice au fost împărţite în *endopeptidaze* care corespund proteinazelor şi care rup legături peptidice, dând naştere la peptide şi *exopeptidaze* care corespund peptidazelor şi care rup legăturile peptidice de la marginea catenei şi dau naştere la aminoacizi.

Pepsina a fost izolată din sucul gastric al vertebratelor, al păsărilor, al unor peşti şi al omului.

Pepsina este secretată de către mucoasa stomacală într-o formă inactivă, *pepsinogenul.* Pepsinogenul este transformat în pepsină, sub influenţa mediului puternic acid din stomac. Pepsina, odată formată, transformă noi cantităţi de pepsinogen în pepsină. Are loc o autocataliză în care pepsinogenul, cu greutatea moleculară de 42 500 suferă o rupere a moleculei cu formare de peptide cu caracter bazic şi caracter acid, a căror masă moleculară este de aproximativ 4 600 şi a unui inhibitor de natură proteică:

$$\text{pepsinogen} \xrightarrow[\text{pH} < 5]{\text{pepsină}} \text{pepsină} + \text{peptide} + \text{inhibitor}$$

Pepsina este activă numai în soluţie puternic acidă (pH optim 1,5 – 2,0). Inhibitorul pepsinei, cu masa moleculară de aproximativ 3 100, reacţionează cu pepsina la pH = 5,6, cu formarea unui complex pepsină – inhibitor, care disociază la valori de pH < 5.

În duoden şi în intestin, unde reacţia este slab bazică (pH = 8), pepsina este complet inactivată şi digestia este continuată de enzimele din sucul pancreatic *(tripsina, chimotripsina* şi *carboxipeptidaza)* şi de amestecul de enzime secretat de mucoasa intestinului.

Pepsina este constituită dintr-o singură catenă polipeptidică, care conţine trei punţi disulfidice şi este formată, predominant, din resturi de amino-

Scanned with OKEN Scanner

acizi monoaminodicarboxilici, resturi de aminoacizi cu caracter hidrofob, resturi de prolină şi hidroxiaminoacizi, mai ales, serină. Aceasta face ca molecula de pepsină să aibă o sarcină globală electronegativă, iar $pH_i = 1$.

Pepsina este o enzimă proteolitică care are activitate protează, dar şi activităţi peptidazice, esterazice şi transpeptidazice.

Activitatea pepsinei este dependentă de două grupări ionizate: una cu un pK_a de aproximativ 1, în forma ei deprotonată, şi alta cu un pK_a de aproximativ 4, sub formă protonată (5).

Mecanismul de acţiune al pepsinei presupune două posibilităţi de formare a unui complex covalent intermediar între enzimă şi substrat: un intermediar amino în care are loc un transfer al unei grupări amino a substratului la o grupare carboxil a enzimei şi un intermediar acil care necesită transferul unei grupări acil a substratului. Este posibil ca în procesul catalitic să se formeze ambii intermediari. Formarea şi disocierea compuşilor covalenţi intermediari sunt procese reversibile.

Pepsina acţionând asupra proteinelor, hidrolizează, cu precădere, legăturile peptidice formate cu participarea resturilor de aminoacizi cu catenă laterală hidrofobă şi a legăturilor peptidice dintre resturile de: Arg-Ile, Gln-Arg, Leu-Lys, Ile-Lys, Glu-Lys, Asn-Thr, Val-Ala, Trp-Trp, Ser-Asp, Gly-Arg, Gly-Glu etc. (5).

PH-ul optim de hidroliză a pepsinei asupra proteinelor este de 1,8 şi variază între $2 < pH < 4$.

Gastricsina, identificată în sucul gastric de la om, câine, porc (în extractul acid al mucoasei gastrice) etc., este o enzimă proteolitică cu pH optim de 3 – 4, caracterizată prin stabilitate în mediul alcalin şi termostabilitate, diferite de ale pepsinei. Este posibil ca gastricsina şi pepsina să se formeze dintr-un precursor comun.

Rennina cu zimogenul său *prorennina*, denumiri adoptate de Comisia de Enzimologie (IUB), este cunoscută sub diferite denumiri: *chimază, chimozină, ferment de coagulare, labferment.* Rennina este enzima din sucul stomacal al animalelor ierbivore tinere, care are o deosebită putere de coagulare a laptelui. După proprietăţile fizico-chimice, se apropie mult de pepsină. Are masa moleculară de 33 000 – 34 000 şi conţine cantităţi mari de serină şi prolină. Rennina se formează din prorennină la $pH < 5$, este stabilă la $pH = 3,5 – 6,3$, are maximum de activitate la $pH = 3,5 – 3,7$ şi se inactivează la valori mai mari de $pH = 6,5$. Rennina hidrolizează unele substrate specifice şi pentru pepsină: hemoglobina, cazeina, catena polipeptidică B a insulinei.

Scanned with OKEN Scanner

Enzimele proteolitice tisulare sunt proteinazele intracelulare care hidrolizează proteinele în mediu slab acid (*catepsinele*) şi *kalikreinele*, enzime proteolitice din glandele salivare şi pancreas şi acţionează la valori de pH alcaline.

Catepsinele au fost izolate din ţesuturi diferite şi caracterizate fizico-chimic. Ele au fost denumite *catepsinele A, B, C, D, E.*

Catepsina A este prezentă în ficat, splină, rinichi, muşchii striaţi, se comportă ca o peptidază şi este similară cu carboxipeptidaza A din pancreas.

Catepsina B se găseşte în splină, rinichi, glandele suprarenale, glanda tiroidă, plămâni, muşchii striaţi. Hidrolizează proteine ca: β – lacto-globulina, edestina (o globulină vegetală din sămânţa de cânepă), gelatina, albumina serică etc., la pH = 5 – 6, care este pH-ul optim.

Catepsina C este prezentă în splină, ficat, rinichi, precum şi în extractele diferitelor ţesuturi animale. În stare pură, are o masă moleculară de 134 000 – 210 000, în funcţie de specia de la care a fost recoltată. La pH = 5, hidrolizează fragmente dipeptidice N-terminale din proteine ca: glucagonul, catena β – a insulinei oxidate, hormonul β – corticotrop etc., peptide, esteri, amide şi naftil-amide ale dipeptidelor.

Catepsina C are acţiune transpeptidazică, atunci când acceptorul grupărilor dipeptidil este o grupare amino şi enzima catalizează o depolimerizare care duce la formarea de oligopeptide (5).

Catepsina D a fost identificată în splină, ficat, glandele suprarenale, glanda tiroidă, muşchii striaţi, creier etc. Catepsina D are o masă moleculară de 50 000 – 60 000, este termolabilă şi hidrolizează la pH = 3 hemoglobina denaturată în mediu acid şi la pH = 4,2 albumina serică denaturată. Nu hidrolizează substratele specifice celorlalte catepsine.

Catepsina E a fost identificată în splină şi în măduva spinării. Este o enzimă termolabilă, are masa moleculară de 305 000 şi hidrolizează hemoglobina şi albumina serică la pH = 2,5 – 3,5. La pH > 4,5, devine inactivă.

Aminopeptidazele sau *α–aminoacil-peptidhidrolazele* sau *peptidhidrolazele* scindează resturile de aminoacizi de la extremitatea N–terminală a proteinelor sau peptidelor. Dintre aminopeptidaze se menţionează: *leucilamino-peptidaza, aminopeptidaza M* şi *aminopeptidazele A* şi *B.*

Leucinaminopeptidaza a fost identificată în splină, rinichi, plămâni, mucoasa intestinală, tiroidă, hipofiză, elementele figurate ale sângelui, ovare, muşchii striaţi etc. Are masa moleculară de 300 000, este o metaloenzimă care conţine Zn^{2+}, este activată de ionii de Mg^{2+} şi Mn^{2+}, are pH-ul optim de acţiune de 8 – 9, are stereospecificitate, deoarece acţionează numai asupra legăturilor peptidice formate de L–aminoacizi şi posedă o largă specificitate de substrat.

Scanned with OKEN Scanner

Leucinaminopeptidaza este utilizată la determinarea secvenţei aminoacizilor de la extremitatea N–terminală a catenelor polipeptidice.

Aminopeptidaza M a fost identificată în rinichi, are o masă moleculară de 280 000 şi hidrolizează preferenţial legăturile peptidice formate prin participarea alaninei, glicinei şi leucinei.

Aminopeptidaza A a fost identificată în ficat, rinichi şi duoden şi este activată de ionii de Ca^{2+}. Are acţiune hidrolitică asupra resturilor de monoaminodicarboxilici de la extremitatea N–terminală a proteinelor şi peptidelor.

Aminopeptidaza B a fost izolată din ficat, hidrolizează aminoacizii bibazici, arginina şi lizina, de la extremitatea N–terminală a lanţurilor peptidice, cu condiţia ca grupele aminice din poziţiile δ şi ε să nu fie blocate.

Enzimele proteolitice ale pancreasului. La vertebrate, sucul pancreatic conţine o serie de enzime active (*ribonucleaza, amilaza, lipaza*) şi enzime sub formă de precursori inactivi (*zimogene)* ca: *tripsinogen, chimotripsinogen A* şi *B, procarboxipeptidaza A şi B*. Enzimele proteolitice pancreatice sunt sintetizate în ribozomii reticulului endoplasmatic ai celulelor acinare din pancreas.

Tripsina se formează din tripsinogen, prin autocataliză, în prezenţa unor mici cantităţi de tripsină sau a unor alte enzime proteolitice (*enterokinaza, kinaza, aspergilopeptidaza A, peptidaza A* etc.).

Tripsina are acţiune catalitică puternică la transformarea zimogenelor altor enzime în formele lor active (chimotripsinogenele A, B, C, procarboxipeptidazele A, B şi a zimogenului fosfolipazei A). Tripsina catalizează legăturile peptidice a căror funcţie carboxil provine de la lizină şi arginină, indiferent de lungimea secvenţei de aminoacizi, precum şi legăturile amidice şi esterice ale acestor doi aminoacizi bazici. Tripsina are zona optimă de acţiune la pH = 7 – 8. Ea face parte dintre peptidazele digestive (tabelul 6.2.) (6).

În tubul digestiv, proteinele sunt hidrolizate de peptidaze până la aminoacizi, care sunt absorbiţi prin mucoasa intestinală. Enzimele care participă la acest proces sunt elaborate de stomac, intestin şi pancreas. Peptidazele, după specificitatea lor, se pot grupa în *endopeptidaze*, care scindează legături peptidice din mijlocul unui lanţ polipeptidic şi *exopeptidaze*, care scindează legături peptidice de la capetele lanţurilor. Exopeptidazele sunt *aminopeptidaze* şi *carboxipeptidaze*, după cum detaşează aminoacizii de la capătul N–terminal sau C–terminal ai lanţului.

Peptidazele digestive, în afara celor intestinale, sunt elaborate iniţial sub formă de zimogeni, pentru a proteja celulele şi canalele secretoare de acţiunea lor proteolitică. Zimogenii devin enzime active în lumenul tubului digestiv. Activarea are loc prin hidroliza unor legături peptidice care detaşează anumite peptide sau aminoacizi sau modifică plierea lanţului polipeptidic

Scanned with OKEN Scanner

şi eliberează centrul activ al enzimei care devine accesibil substratului. Activarea zimogenului are loc în prezenţa ionilor de hidrogen, sub acţiunea unor peptidaze active sau autocatalitice, enzima activându-şi propriul ei precursor.

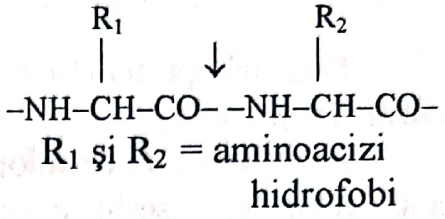
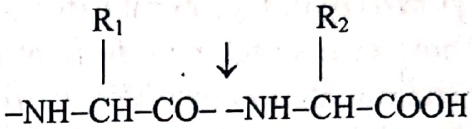
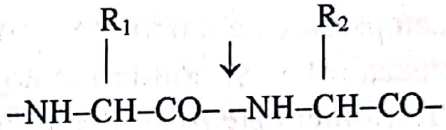
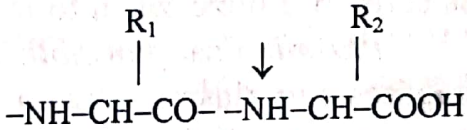
Tripsina este o endopeptidază pancreatică, elaborată ca tripsinogen şi este activată autocatalitic sau sub acţiunea unei peptidaze intestinale specifice, *enterokinaza*. Conversia tripsinogenului în tripsină se produce prin detaşarea unui hexapeptid de la capătul N–terminal al tripsinogenului.

Chimotripsina este o endopeptidază pancreatică. Ea este elaborată ca *tripsinogen* care se activează în lumenul intestinal sub acţiunea tripsinei ce detaşează patru aminoacizi sub forma a două dipeptide. Acţiunea hidrolitică a chimotripsinei are loc, mai ales, asupra legăturilor peptidice, a căror grupare carboxil provine de la fenilalanină, tirozină sau triptofan.

Tabelul 6. 2.

Peptidazele digestive

Peptidaza	Ţesutul care elaborează	Zimogenul	Activarea zimogenului	Specificitatea de acţiune
Pepsină	Stomac	Pepsinogen	H^+ şi pepsină	R_1 ↓ R_2 –NH–CH–CO– –NH–CH–CO– R_2 = tirozină, fenilalanină
Gastricsină	Stomac	Pepsinogen	H^+ şi pepsină	R_1 ↓ R_2 –NH–CH–CO– –NH–CH–CO– R_2 = tirozină, fenilalanină
Tripsină	Pancreas	Tripsinogen	Enterokinază şi tripsină	R_1 ↓ R_2 –NH–CH–CO– –NH–CH–CO– R_1 = lizină, arginină
Chimotripsină	Pancreas	Chimotripsinogen	Tripsină	R_1 ↓ R_2 –NH–CH–CO– –NH–CH–CO R_1 = tirozină, fenilalanină, triptofan

Elastază	Pancreas	Proelastază	Tripsină	 R_1 şi R_2 = aminoacizi hidrofobi
Carboxi-peptidază	Pancreas	Procarboxi-peptidază	Tripsină	
Amino-peptidază	Intestin	–	–	
Dipep–tidază	Intestin	–	–	

Elastaza, endopeptidază pancreatică, este secretată de pancreas sub formă de *proelastază* şi activată în lumenul intestinal de tripsină. Hidrolizează cu uşurinţă elastina, dar are specificitate pentru legăturile peptidice ale aminoacizilor cu radicali hidrofobi şi, de aceea, participă la digestia altor proteine.

Carboxipeptidaza este o exopeptidază pancreatică secretată sub formă de *procarboxipeptidază* şi este activată de tripsină. Hidrolizează legăturile peptidice de la capătul C–terminal al lanţurilor peptidice.

Aminopeptidaza este o exopeptidază elaborată de mucoasa intestinală şi acţionează asupra legăturilor peptidice de la capătul N–terminal al lanţurilor peptidice.

Dipeptidazele sunt un grup de enzime secretate de mucoasa intestinală şi hidrolizează dipeptidele rezultate la hidroliza produsă de peptidazele digestive, endo- sau exopeptidaze.

Scanned with OKEN Scanner

6.5.2. ENZIME PROTEOLITICE ALE SÂNGELUI

Enzimele proteolitice ale sângelui sunt: *trombina, plasmina, kalikreina, carboxipeptidaza N.*

Trombina este o endopeptidază care participă la procesul de coagulare a sângelui. Se găseşte în plasma sanguină într-o formă inactivă, zimogenul *protrombina* şi, numai în cantitate mică, se află ca enzimă activă. Protrombina este sintetizată de ficat şi este transformată în trombină activă de către enzima *autoprotrobina C (trombokinaza).* Transformarea protrombinei în trombină se realizează şi în prezenţa unor enzime proteolitice ca, tripsina, catepsina C, a enzimelor proteolitice din veninul de şarpe. Trombina hidrolizează esteri şi amide ale argininei şi lizinei la pH = 8. Substratul natural al trombinei este *fibrinogenul* (proteină fibrilară solubilă din plasma sanguină) pe care-l hidrolizează cu formare de fibrinopeptide A şi B.

Plasmina sau *fibrinolizina,* enzimă cu specificitate de substrat redusă, se găseşte în plasma sanguină, în cea mai mare, parte sub formă de *plasminogen* sau *profibrinolizină,* precursor inactiv catalitic secretat de eozinofilele măduvei osoase şi face parte din fracţiunea β–globulinelor plasmatice. Trecerea plasminogenului în plasmină este un proces autocatalitic, dar poate fi catalizat şi de alte enzime ca: tripsina, streptokinaza şi urokinaza.

Plasmina şi plasminogenul sunt termorezistente şi stabile la pH = 2 – 3. Plasmina umană şi de bovine încălzită la temperatura de 100°C, timp de 30 min, la pH = 1,8, păstrează 40 % din activitate.

Fibrina şi *fibrinogenul* sunt substratele naturale ale plasminei pe care le hidrolizează, iar compuşii rezultaţi au activitate anticoagulantă. La pH-ul fiziologic, hidrolizează, de asemenea, β – lactoglobulina, hemoglobina denaturată, cazeina, gelatina, esteri ai lizinei şi argininei.

Kalikreina plasmatică este biosintetizată de ficat şi are acţiune asupra *kininogenului plasmatic,* punând în libertate *bradikinina,* o nonapeptidă care determină contracţia muşchilor netezi şi este un vasodilatator. Kalikreina plasmatică diferă de kalikreinele pancreasului şi ale glandelor salivare prin capacitatea ei catalitică şi proprietăţile fizico-chimice. Kalikreina este elaborată de ficat sub formă de *prekalikreină* sau *kalikreinogen,* care, în prezenţa tripsinei sau a factorului Hageman (o enzimă de tip protează), este transformat în enzimă activă.

Carboxipeptidaza N se găseşte în serul sanguin al mamiferelor, peştilor, amfibienilor, păsărilor, în limfa, urina şi trombocitele de om şi acţionează asupra bradikininei, kalidinei şi se deosebeşte prin specificitatea de substrat şi raporturile ei cu activatorii şi inhibitorii de carboxipeptidazele A

Scanned with OKEN Scanner

şi B izolate din ficat (5). Carboxipeptidaza N este activată de Co şi Ni şi inactivată de Cd şi de acidul ε – aminocapronic.

6.5.3. ENZIME PROTEOLITICE DE ORIGINE VEGETALĂ

Dintre enzimele de origine vegetală, de însemnătate mai mare sunt: *papaina, chimopapaina, ficina, bromelaina.*

Papaina a fost extrasă din arborele *Carica papaja*, din toate părţile plantei afară de rădăcină, dar, în special, din fructele arborelui. Latexul de *Carica papaia* conţine *papaiana, chimopapaina* şi *peptidaza A*. Papaina cristalizată are $pH_i = 9$, o masă moleculară de 20 700 şi o activitate catalitică scăzută. Creşterea activităţii catalitice se produce în prezenţa unor reducători ca: cisteina, glutationul redus, acidul tioglicolic, borohidrura de sodiu, a unor compuşi capabili să lege ionii metalelor. Papaina este inhibată reversibil de apa oxigenată şi ireversibil de iod, iodacetat, iodacetamidă, bromacetat, p-clormer-curbenzoatul de sodiu.

Molecula de papaină constă dintr-un lanţ polipeptidic format din 212 resturi de aminoacizi, cu trei punţi disulfidice, o grupă sulfhidril liberă şi conţine patru regiuni cu structură de α–helix.

Papaina, enzimă proteolitică, are o largă specificitate de substrat. Ea catalizează hidroliza proteinelor native şi denaturate, a peptidelor rezultate în urma acţiunii tripsinei şi chimotripsinei, hidrolizează toate legăturile peptidice, indiferent de natura aminoacizilor.

Chimopapaina a fost separată din latexul arborelui *Carica papaja*, are o acţiune hidrolitică mai mare decât a papainei, o masă moleculară de 27 000 – 35 000 şi este mai rezistentă la valori de pH acide în comparaţie cu papaina.

Ficina s-a obţinut din latexul de *Ficus glabrala, Ficus carica varietatea Calimyrna, Ficus carica varietatea Kadota*, are masa moleculară de 25 000 – 26 000, este formată dintr-o singură catenă polipeptidică, este o tiol-enzimă care se inactivează de către agenţii oxidanţi sau cei care blochează grupările SH. Ficina are o largă specificitate de substrat, hidrolizând numeroase proteine prin scindarea legăturilor peptidice dintre resturile de tirozină şi fenilalanină, la pH = 6,5 – 9,5.

Bromelaina reprezintă un grup de enzime care s-au extras din fructele şi din alte părţi ale plantei *Bromeliaceae*. Este formată dintr-un singur lanţ polipeptidic ce conţine 285 aminoacizi şi o singură grupare tiol, are o masă moleculară de 33 000 – 35 500.

Scanned with OKEN Scanner

6.5.4. ENZIME PROTEOLITICE MICROBIENE ŞI FUNGICE

Microorganismele produc şi eliberează în mediul de cultură numeroase exoenzime proteolitice, în majoritate, zimogene, care, în general, se caracterizează prin conţinutul redus de tioaminioacizi, un număr mic sau absenţa totală a punţilor disulfidice şi caracterul apolar al majorităţii aminoacizilor componenţi. După structura centrului activ al enzimelor proteilitice microbiene şi fungice se pot grupa în: *serin-enzime, tiol-enzime, metal-enzime, proteinaze acide* şi *proteinaze bazice* (5). Pe lângă exoenzime, microorganismele elaborează numeroase peptidaze şi proteinaze intracelulare.

Diferite tulpini de *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Pseudomonas aeruginosa, Streptomyces grizeus* şi *fradiae, Aspergillus oryzae, Aspergillus flavus,* diferite tulpini de *Clostridium* (*Clostridium histolyticum, Clostridium perfringens*) etc., dau în mediul de cultură proteaze alcaline cu activitate optimă la pH = 8 – 10 şi proteaze neutre.

Dintre *proteazele alcaline*, se menţionează *Subtilizinele*, *Subtilizina A* şi *Subtilizina B* elaborate de diferite tulpini de *Bacillus subtilis* şi *Subtilizina C* elaborată de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Proteaza alcalină* izolată din *Bacillus subtilis varietatea amylosaccariticus*, *Proteaza alcalină* şi *Elastaza* produse de *Pseudomanas aeruginosa*, *Proteaza G* elaborată de *Streptomyces grizeus, Keratinaza* elaborată de *Streptomyces fradiae, Proteaza neutră* din *Bacillus subtilis, Aspergilopeptidaza B* din culturile de *Aspergillus oryzae* şi *Colagenaza (Clostridiopeptidaza A)* din diferite tulpini de *Clostridium*.

Subtilizinele hidrolizează cu rapiditate proteinele denaturate, esterii şi amidele aminoacizilor, esterii acizilor graşi inferiori. La pH = 5, se denaturează ireversibil.

Proteaza alcalină provenită de la *Pseudomanas aeruginosa* are o masă moleculară de 48 500, un pH optim de acţiune de 7 până la 9 şi este stabilă în intervalul de pH de 5,0 şi 9,0. Hidrolizează hemoglobina, ovalbumina, cazeina, gelatina şi nu are acţiune asupra colagenului.

Elastaza din *Pseudomanas aeruginosa* are o masă moleculară de 39 500, are un optim de acţiune la pH = 8, scindează elastina şi alte proteine (dar nu şi colagenul nativ şi keratina), hidrolizând legăturile peptidice formate prin participarea grupelor aminice de la alanină, leucină, valină, fenilalanină, tirozină. Elastaza, faţă de alte proteaze alcaline, conţine tioaminoacizii metionina şi cistina, precum şi legătura *Cys – S – S – Cys*.

Scanned with OKEN Scanner

Proteaza G obţinută din *Streptomyces grizeus* şi *Streptomyces fradiae* alături de alte peptidaze, hidrolizează la pH = 7 – 8 ovalbumina, cazeina, glutelina.

Keratinaza, separată din culturile de *Streptomyces fradiae,* are o masă moleculară de 27 000, hidrolizează keratina nativă cu formare de peptide, la pH = 9, ca şi pe alte proteine ca hemoglobina, cazeina.

Din culturile de *Aspergillus oryzae*, s-a preparat proteaza alcalină *Aspergilo-peptidaza B*, cu o masă moleculară de 18 000. Această protează este termolabilă, sensibilă la agenţii denaturanţi ca ureea, guanidina hidroclorică şi acţionează hidrolizant asupra cazeinei la pH = 10,3 – 10,5.

Protează neutre au fost izolate din filtratele unor culturi ca: *Bacillus subtilis, Bacillus subtilis varietatea amylosaccharitícus* şi *Bacillus amyloliquefaciens.* Produc hidroliza unui număr mare de proteine (gelatină, cazeină, ovalbumină, hemoglobină etc.) şi acţionează optim la pH = 6 – 8.

Protează neutre de la *Bacillus subtilis* hidrolizează legăturile peptidice formate de aminoacizii: leucina, izoleucina, valina, fenilalanina.

Colagenaza (*Clostridiopeptidaza A*) este un reprezentant al proteazelor neutre şi rezultă din unele tulpini ale genului *Clostridium* (*Clostridium histolyticum, Clostridium perfringens*). Are o mare specificitate de substrat. Hidrolizează colagenul nativ şi denaturat la temperatură şi pH fiziologice. Nu hidrolizează proteinele globulare: globulina, albumina, cazeina şi nici proteine fibrilare ca: elastina, keratina, fibroina. Colagenaza scindează legăturile peptidice din imediata.vecinătate a resturilor de prolină şi hidroxiprolină şi la care participă un rest de glicină.

Protează acide izolate din fungii au proprietatea de a transforma tripsinogenul în tripsină. O astfel de peptidază este *Aspergilopeptidaza A* obţinută din ciuperca microscopică *Aspergillus saitoi*, care hidrolizează diferite proteine naturale la pH = 2,5 – 3,0, şi are o specificitate de substrat mai largă decât pepsina. Aspergilopeptidaza A este stabilă la valori de pH cuprinse între 2,5 şi 6,0. Aceasta se datorează cantităţii mari de resturi de aminoacizi monoamino-monocarboxilici şi monoaminodicarboxilici care se găsesc în structura enzimei şi îi conferă caracter acid.

Din *Penicillium janthinellum, Aspergillus orizae, Aspergillus orizae,* varietatea *macrosporus, Paecilomyces varioti* etc., s-au separat proteaze acide denumite *„peptidaze A"* şi *„peptidaze B"* care transformă tripsinogenul în tripsină şi au proprietăţi fizico-chimice asemănătoare cu ale protează acide *Aspergilopeptidaza A.*

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă:

1. Lehninger, A.L., *Biochimie*, vol. I şi II, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, 1992.
2. Nenițescu, C.D., *Chimie Organică*, vol. I şi II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti. 1980.
3. Chiriță, G., Chiriță, M., *Pielea animală*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1993.
4. Chiriță, M., *Biopolimeri şi Compozite Naturale*, Editura Tehnică-Info, Chişinău, 2001.
5. Dumitru, I.F., Iordăchescu, D., *Introducere în Enzimologie*, Editura Medicală, Bucureşti, 1981.
6. Popescu, A., Cristea, E., Zamfirescu-Gheorghiu, M., *Biochimie Medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1980.
7. Dumitru, I.F., Iordăchescu, D., *Enzime*, Editura Medicală, Bucureşti, 1974.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7

ACIZII NUCLEICI

7.1. Noţiuni generale 226
7.2. Pirimidine şi purine 227
7.2.1. Pirimidina 227
7.2.2. Purina 229
7.3. Nucleozide 231
7.4. Nucleotide 232
7.5. Acidul dezoxiribonucleic (ADN) 234
7.5.1. ADN viral 242
7.5.2. ADN bacterian 242
7.5.3. Cromozomii eucariotelor 242
7.5.4. Rolul genetic al ADN 245
7.5.5. Proprietăţile ADN în soluţie 247
7.6. Acidul ribonucleic (ARN) 249
7.6.1. Acidul ribonucleic mesager (ARNm) 250
7.6.2. Acidul ribonucleic de transfer (ARNt) 252
7.6.3. Acidul ribonucleic ribozomal (ARNr) 254
7.6.4. Ribozomii 255
7.6.5. Virusurile 255
7.7. Acţiunea şi interacţiunea genelor 257
7.7.1. Reglarea activităţii genelor 262
7.8. Măsurarea concentraţiei şi purităţii acizilor nucleici 266
7.8.1. Metode optice 266
7.8.2. Metoda fluorescenţei 266
7.9. Păstrarea ADN 267
7.10. Purificarea ADN 267
7.11. Precipitarea ADN 268
7.12. Izolarea ADN din *Escherichia coli* 268
7.13. Izolarea plasmid ADN 269

Bibliografie *271*

7.1. NOȚIUNI GENERALE

Acizii nucleici se găsesc în toate celulele vii, inclusiv în virusuri. Ei au calitatea de a se reproduce întocmai şi participă la biosinteza proteinelor. Datorită lor, diviziunea celulară duce la celule identice.

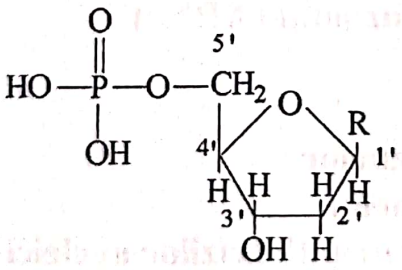
Acizii nucleici sunt molecule complexe, produse de celulele vii şi sunt esențiale pentru viața organismelor. Aceşti acizi guvernează dezvoltarea organismului şi caracteristicile specifice provenite de la informațiile ereditare şi activează sinteza proteinelor în celule. Ei asigură transmiterea caracterelor ereditare şi, deci, identitatea, în timp, a indivizilor şi a speciilor. În general, acizii nucleici sunt legați slab de proteine (protamine şi histone).

Acizii nucleici se pot extrage din biomateriale cu apă sau cu soluții saline. Sunt compuşi macromoleculari rezultați prin policondensarea unor unități simple, *nucleotide* sau *mononucloetide*. Deci, acizii nucleici sunt nişte *polinucleotide*.

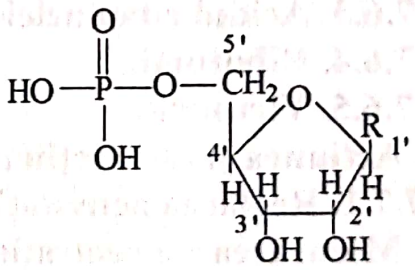
Nucleotidele pot fi considerate una dintre cele mai importante metabolite ale celulei. Ele sunt compuse din:

- o bază pirimidinică sau purinică;
- o monozaharidă şi anume, o pentoză;
- un rest de acid fosforic esterificat cu unul din hidroxilii pentozei.

Acizii nucleici pot fi transformați în nucleotide prin hidroliză blândă, cu o soluție diluată de amoniac sau pe cale enzimatică cu *nucleaze*: *polinucleozidaze* (*ribonuclează* şi *dezoxiribonuclează*), *nucleotidaze* şi *nucleozidaze*.



O dezoxiribonucleotidă
R = o bază pirimidinică sau purinică



O ribonucleotidă
R = o bază pirimidinică sau purinică

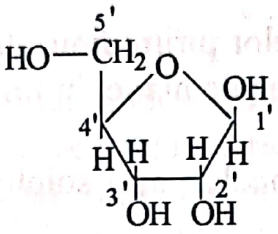
Supunând hidrolizei acizii nucleici sau nucleotidele cu soluții mai concentrate de amoniac sau nucleotidele cu nucleotidaze, se îndepărtează restul de acid fosforic şi se obțin nucleozide, care sunt compuse numai din

Scanned with OKEN Scanner

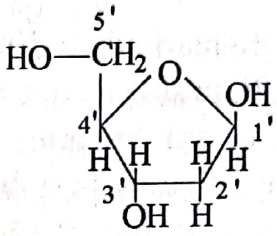
baze pirimidinice şi purinice şi pentoze: *adenozină, guanozină, citidină, uridină* etc. Nucleotidele sunt, deci, *acizi nucleozid-fosforici.*

Sunt două tipuri de acizi nucleici: *acizii dezoxiribonucleici* (ADN), care se găsesc în nucleele celulelor şi *acizii ribonucleici* (ARN), care se găsesc, mai ales, în plasma celulară, dar în cantităţi mici şi în nuclee.

Monozaharida din ADN este *2–dezoxi-D-riboza*, iar cea din ARN este *D–riboza.*



D–riboză



2'–Dezoxi–D–riboză

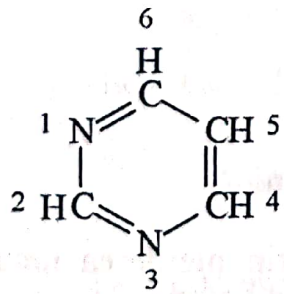
În ADN se găsesc două baze pirimidinice, *citozina* (C) şi *timina* (T) şi două baze purinice, *adenina* (A), şi *guanina* (G). În ARN, se găsesc aceleaşi baze purinice, ca şi în ADN, baza pirimidinică citozina, iar în locul timinei, apare *uracilul* (U).

7.2. PIRIMIDINE ŞI PURINE

Combinaţiile de la care derivă cele două clase de baze azotate din nucleotide sunt combinaţiile heterociclice: *pirimidina* şi *purina*.

7.2.1. PIRIMIDINA

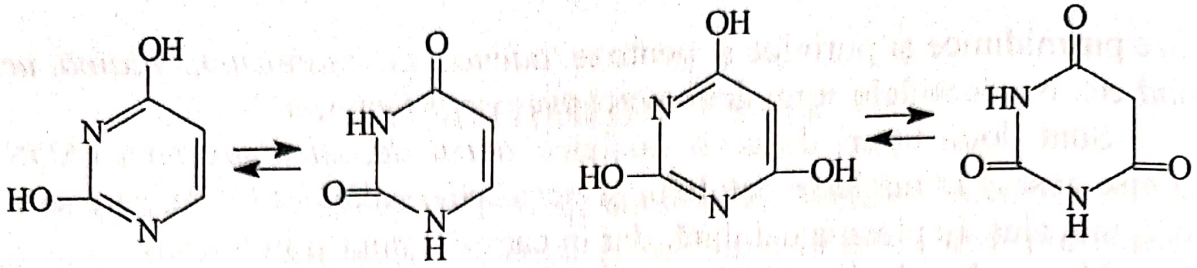
Inelul pirimidinic se găseşte în natură sub formă de derivaţi hidroxilaţi sau condensat cu inelul benzenic (în *chinazoline*), cu inelul imidazolic (în *purine*), cu inelul pirazolinic (în *pteridine*) şi cu inelul chinoxalinic (în *aloxazine*).



Pirimidina

Derivaţii acestor sisteme ciclice se întâlnesc într-o serie de produşi naturali (*vitamine, coenzime, acizi nucleici*).

Hidroxipirimidinele pot reacţiona după două forme tautomere (1):



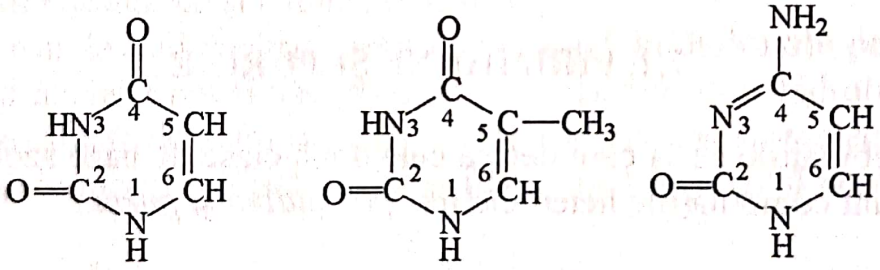
2,4-Dihidroxipirimidină (uracil) 2,4,6-Trihidroxipirimidină

Structura tridimensională a diferitelor pirimidine, stabilită prin analiza de difracție cu raze X, arată că sunt molecule plane, în timp ce purinele sunt aproape plane, cu o ușoară deviație.

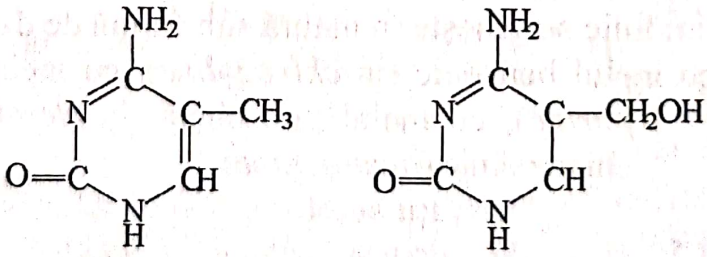
Pirimidina este un compus stabil, incolor, ușor solubil în apă, cu reacție neutră, iar cu acizii tari, formează săruri.

Derivații simpli ai pirimidinei, substituiți la nucleu cu grupe alchil, aril, halogen și nitro, dar nu cu grupe hidroxil sau amino, au caracter aromatic și se comportă asemănător pirimidinei.

Substituienții legați la nucleul pirimidinic în poziția 5 reacționează, în general, la fel ca atunci când sunt legați de un nucleu aromatic. În pozițiile 2, 4 și 6, care sunt vecine cu atomii de azot, se observă abateri însemnate de la această comportare.



Uracil Timina Citozina



5-Metilcitozină 5-Hidroximetilcitozină

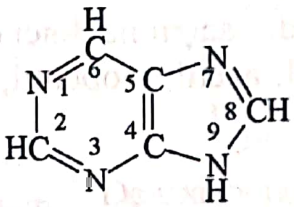
Hidroxipirimidinele au caracter acid, deoarece, prin pierderea unui proton, se obține un anion cu posibilități de conjugare mărite. Introducerea unei grupe NH_2 mărește bazicitatea moleculei.

Uracilul, timina şi *citozina* sunt derivaţi pirimidinici şi prezintă interes deosebit, deoarece sunt produşi de degradare ai acizilor nucleici.

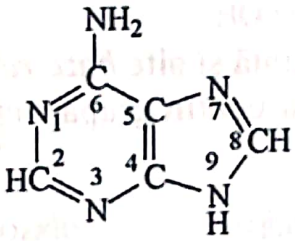
Pe lângă bazele obişnuite, prezentate mai sus, în acizii nucleici, se mai găsesc, în cantităţi mici, şi alţi derivaţi pirimidinici, aşa zisele *baze rare*, aşa cum sunt: *5–metil-citozina* şi *5–hidroxi-metil-citozina*.

7.2.2. PURINA

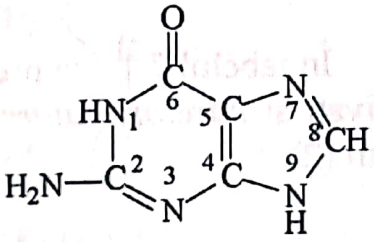
Grupa purinei cuprinde produşi naturali de importanţă deosebită pentru fiziologia animală şi vegetală. Astfel, *adenina, o amino-purină* şi *guanina, o hidroxi-amino-purină*, sunt componente ale acizilor nucleici şi se găsesc în concentraţii mici şi în stare liberă, în variate materiale de provenienţă animală şi vegetală: ficat, muşchi, urină, placentă, drojdie de bere, sfeclă de zahăr, ceai etc. Adenina este componenta unor nucleotide care îndeplinesc, în organismele vii, funcţii de coenzime.



Purina

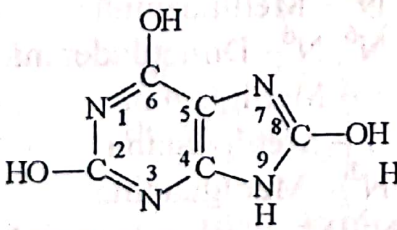


Adenina

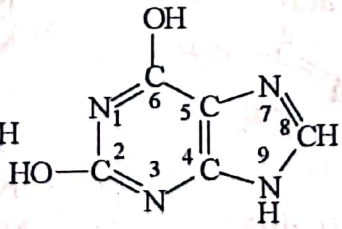


Guanina

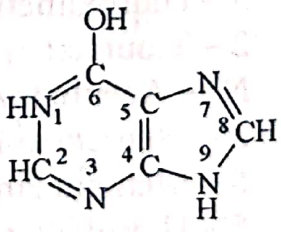
Prin dezaminarea şi oxidarea biologică a adeninei şi guaninei, se formează trei hidroxipurine: *acidul uric, xantina* şi *hipoxantina*, mult răspândite în natură.



Acid uric



Xantina



Hipoxantina

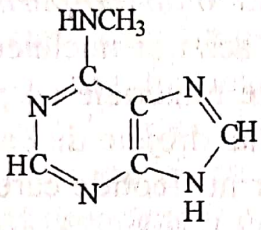
De la adenină, derivă o grupă de compuşi de mare importanţă: *acizii adenozin fosforici, codehidrazele* şi *diaforazele*.

Scanned with OKEN Scanner

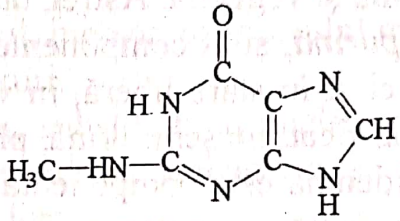
Purina conține un sistem biciclic condensat compus dintr-un inel pirimidinic și un inel imidazolic. Are un caracter aromatic, mult atenuat la hidroxipurine și aminopurine. Purina formează cristale incolore, solubile în apă, neutre, rezistente la oxidare.

Adenina și guanina sunt compuși cristalini, greu solubili în apă, se descompun la o încălzire de peste 300°C fără a se topi. Cu hidroxizii alcalini formează săruri care sunt ușor solubile.

În afară de adenină și guanină, în acizii nucleici, se mai găsesc, în cantități mici și alți derivați purinici, așa-zisele *baze purinice rare*, printre care se menționează: *6-metiladenina* și *2-metilguanina*.



6-Metiladenina



2-Metilguanina

În tabelul 7.1., se prezintă și alte *baze rare* din acizii nucleici care sunt derivați ai *bazelor majore* și conțin grupări metil, acetil, izopentil, hidroximetil (2).

Tabelul 7.1.

Baze rare din acizii nucleici

5, 6 – Dihidroxiuracil	1 – Metiladenină
1 – Metiluracil	2 – Metiladenină
3 – Metiluracil	7 – Metiladenină
5 – Hidroximetiluracil	N^6 – Metiladenină
2 – Tiouracil	N^6, N^6– Dimetiladenină
N^4 – Acetilcitozină	1 – Metilguanină
3 – Metilcitozină	7 – Metilguanină
5 – Metilcitozină	N^2 – Metilguanină
5 – Hidroximetilcitozină	N^2, N^2 – Dimetilguanină

S-au găsit peste 30 de baze rare în acizii ribonucleici de transfer (ARNt), care reprezintă circa 10 % din cantitatea totală de baze.

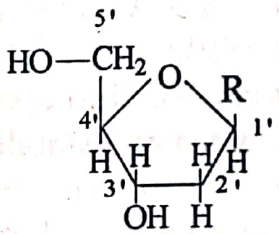
Scanned with OKEN Scanner

Toate bazele purinice şi pirimidinice absorb puternic în ultraviolet, în regiunea 250 – 280 nm. Această proprietate este folosită la detectarea şi analiza cantitativă a bazelor libere, precum şi a nucleotidelor şi nucleozidelor (2).

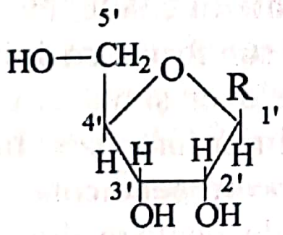
7.3. NUCLEOZIDE

Există două serii de nucleozide: *ribonucleozidele*, care conţin ca parte glucidică D–riboza şi *dezoxiribonucleozidele*, care conţin ca parte glucidică 2–dezoxi–D–riboză.

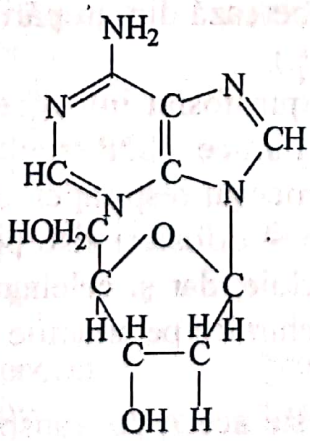
Nucleozidele sunt mult mai solubile în apă decât bazele corespunzătoare şi sunt relativ stabile la alcalii. Nucleozidele purinice sunt uşor hidrolizate de acizi, formând baze libere şi pentoze, în timp ce nucleozidele pirimidinice sunt rezistente la hidroliza acidă. Nucleozidele în stare liberă se găsesc sub formă de urme în celule, ca produşi ai hidrolizei enzimatice sau chimice a nucleotidelor.



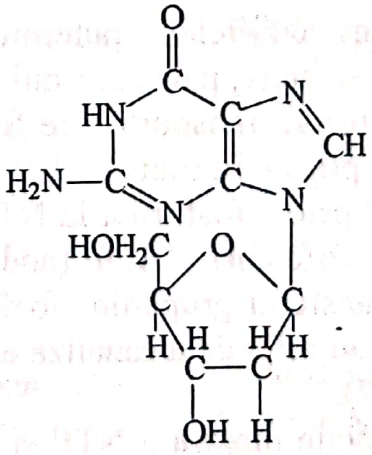
Dezoxiribonucleozidă
R = O bază purinică
sau pirimidinică



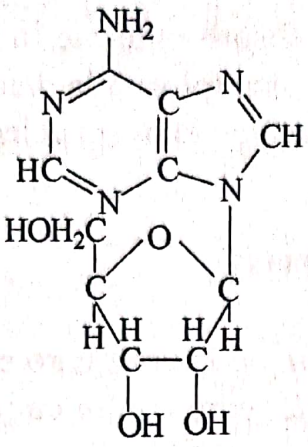
Ribonucleozidă
R = O bază purinică
sau pirimidinică



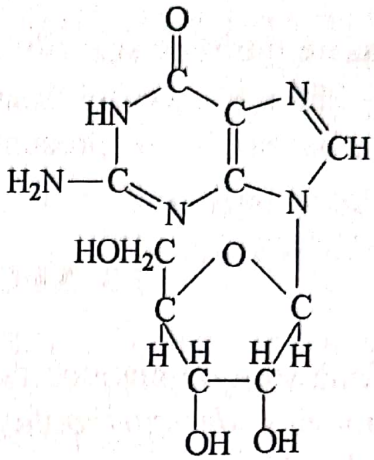
2'-Dezoxiadenozină



2'-Dezoxiguanozină



Adenozină



Guanozină

7.4. NUCLEOTIDE

Ribonucleotidele şi dezoxiribonucleotidele, în stare liberă, se găsesc în cantităţi însemnate în celule, îndeosebi în forma $N–O–PO_3^{2-}$, unde N = nucleozidul, dar şi sub formă de difosfaţi şi trifosfaţi.

Nucleotidele, ca şi nucleozidele conţin două cicluri aproape plane: cel al bazei şi cel al ribofuranozei. În conformaţia cea mai stabilă, cele două cicluri sunt aproape perpendiculare unul pe altul.

Resturile de pentoze din nucleotide se găsesc în formă furanozică. Bazele purinice şi pirimidinice sunt legate printr-unul din atomii lor de azot la carbonul din poziţia 1' al pentozei (legături β-glicozidice); deci, nucleotidele sunt N–glicozide (1).

Acizii nucleozid 5'– difosforici (NDP) şi acizii nucleozid 5'– trifosforici (NTP) sunt acizi relativ puternici şi eliberează din grupările fosfat condensate trei, respectiv, patru protoni (fig. 7.1.).

NTP este un transportor de fosfat şi pirofosfat într-o serie de reacţii enzimatice implicate în transferul energiei chimice. NDP rezultat prin defosforilarea NTP este refosforilat la NTP în procesul respiraţiei. Sistemul ATP (adenozin 5'– trifosfat) – ADP (adenozin 5' – difosfat) este principalul sistem pentru transferul grupărilor fosfat în celule, dar şi celelalte NTP (GTP, UTP şi CTP) au rolul de a canaliza energia chimică pe anumite căi biosintetice specifice (2).

Altă funcţie majoră a NTP şi NDP este aceea de transportori energizanţi de tip coenzimă ai unor elemente constitutive. De exemplu, uridin difosfatul (UDP) este un transportor specific pentru glucide în procesul de biosinteză al polizaharidelor.

Scanned with OKEN Scanner

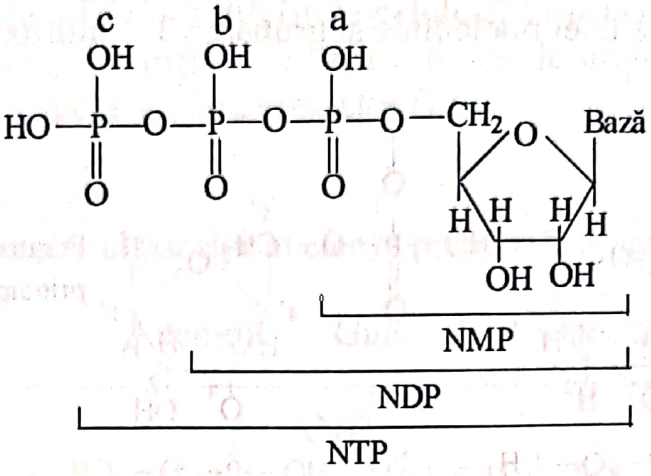
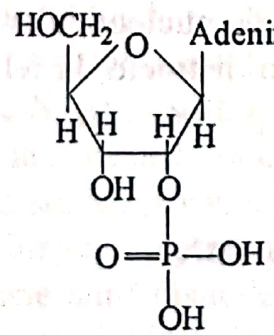


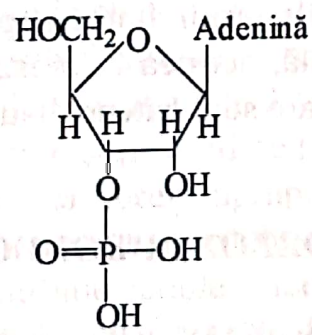
Fig. 7. 1. Structura generală a nucleozid 5' – mono- , 5' – di- şi 5' trifosfaţilor (NMP, NDP, NTP). În dezoxiribonucleozid, fosfaţii corespunzători (dNMP, dNDP şi dNTP) pentoza este 2–dezoxi–D–riboza (2)

O funcţie majoră a NTP şi dNTP este aceea de precursori bogaţi în energie a mononucleotidelor în biosinteza enzimatică a ADN şi ARN. În acest proces, NTP şi dNDP îşi pierd grupările pirofosfat terminale, transformându-se în resturi de nucleozid monofosfaţi, elemente constitutive ale acizilor nucleici. În toate cele trei funcţii ale NTP şi dNTP, energia chimică a legăturilor fosfat b şi c (fig. 7.1.) este folosită la formarea unor legături covalente noi (2).

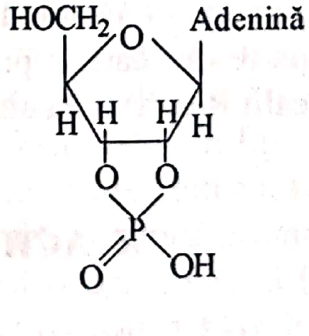
În natură, există nucleotide care au grupările fosfat şi în alte poziţii decât în nucleozid 5' – fosfaţi, ca de exemplu, în acidul adenozin 2' – fosforic, acidul adenozin 3' – fosforic, acidul adenozin 2', 3' – fosforic ciclic:



Acid adenozin 2' –fosforic



Acid adenozin 3' –fosforic



Acid adenozin 2', 3' – fosforic ciclic

Acizii dezoxiribonucleici (ADN) şi ribonucleici (ARN).

Acidul dezoxiribonucleic (AND) este format din dezoxiribonucleotide, iar acidul ribonucleic (ARN) din ribonucleotide. La AND ca şi la ARN nu-

cleotidele succesive sunt legate covalent prin punți fosfodiesterice între gruparea 5' – hidroxil a unei nucleotide și gruparea 3' – hidroxil a nucleotidei următoare (fig. 7.2.).

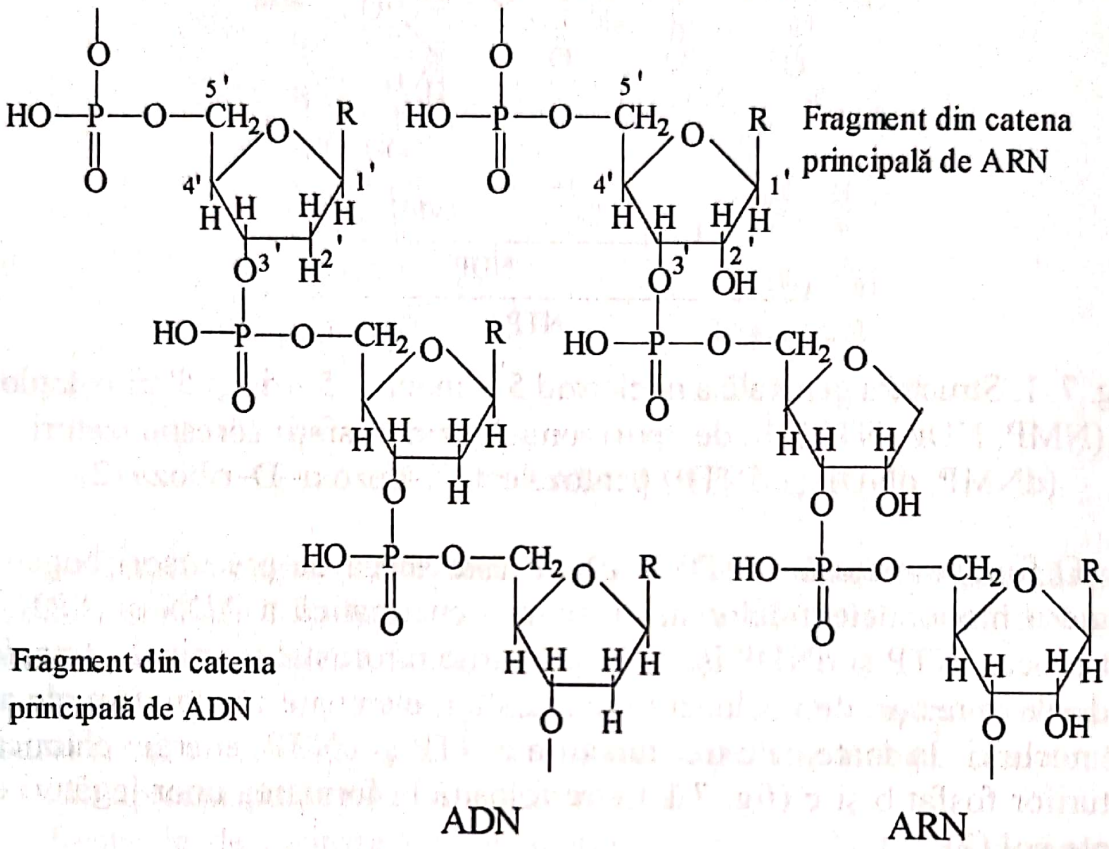


Fig. 7.2. Structura covalentă a catenei principale a lanțurilor de acizi nucleici

Catena principală a ADN și ARN este formată din grupări fosforice, alternând cu pentoze în formă furanozică; legăturile fosfodiesterice asigură continuitatea covalentă. Bazele pirimidinice și purinice ale nucleotidelor nu fac parte din catena principală; acestea formează catene distincte, la fel ca radicalii R ai aminoacizilor care sunt catene distincte ale polipeptidelor.

7.5. ACIDUL DEZOXIRIBONUCLEIC (ADN)

Acidul dezoxiribonucleic (ADN) este materialul genetic din organismele celulare și din cele mai multe virusuri. În organismele celulare, ADN se găsește pe cromozomi. Acidul dezoxiribonucleic a fost izolat din celulele și sperma de somon de către Friedric Miescher în 1869 și, apoi, au urmat 80 – 90 de ani de cercetări, până la cunoașterea completă a structurii și a rolului său în organismele vii.

Scanned with OKEN Scanner

Moleculele de ADN din diferitele celule şi virusuri se deosebesc prin masa lor moleculară, proporţia celor patru tipuri de monomeri nucleotidici (tabelul 7.2.) şi prin secvenţa nucleotidelor (2).

Tabelul 7. 2.

Procentul molar al bazelor în câteva preparate de acizi nucleici

	Adenină	Guanină	Citozină	Timină	Uracil
			AND		
Uman	30,9	19,9	19,8	29,4	–
Escherichia coli	24,7	26,0	25,7	23,6	–
			ARN		
Ficat de bou (amestec)	17,1	27,3	33,9	–	21,7
Escherichia coli, în ARNm	25,1	27,1	24,1	–	23,7
Virusul mozaicului tutunului	20,8	25,4	18,5	–	26,7

Sunt enzime care clivează acizii nucleici la legătura de la $C^{5'}$, formându-se mononucleotide fosforilate la $C^{3'}$, iar alte enzime duc la nucleotide fosforilate la $C^{5'}$.

Macromoleculele de ADN, de diferite proveniențe, conţin de la câteva mii la câteva milioane de resturi de mononucleotide. Astfel de molecule foarte mari pot fi văzute cu microscopul electronic şi au înfăţişarea unor fire foarte lungi. Acizii dezoxiribonucleici (ADN) de la mamifere au greutăţi moleculare de $6 - 8.10^6$, iar de la bacteria *Escherichia coli* de $1\ 000.10^6$ (1).

ADN poate fi obţinut sub formă de fibre orientate, care, la analiza cu raze X, prezintă o perioadă de identitate de 3,4 Å, ceea ce indică o structură în care resturile plane de purine şi pirimidine (R din formulele din fig. 7.2.) sunt situate perpendicular pe axa fibrei, suprapuse ca monedele într-un fâşic, iar inelele de pentoză sunt în planuri paralele cu axa fibrei. Două asemenea catene sunt răsucite în forma unei duble elice, având o axă comună (J.D. Watson, F.H.C. Crick). Ambele elice sunt de dreapta şi au 10 resturi de nucleotide pe spiră, iar diametrul moleculei este de 20 Å (fig. 7.3.) (1) şi prezintă o canelură mare şi una mică (fig. 7.4.) (3).

Scanned with OKEN Scanner

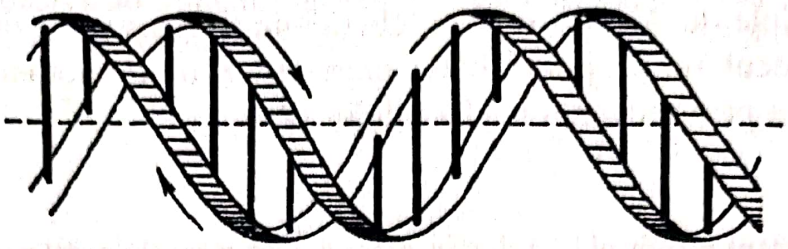


Fig. 7. 3. Dublă elice de ADN (1)

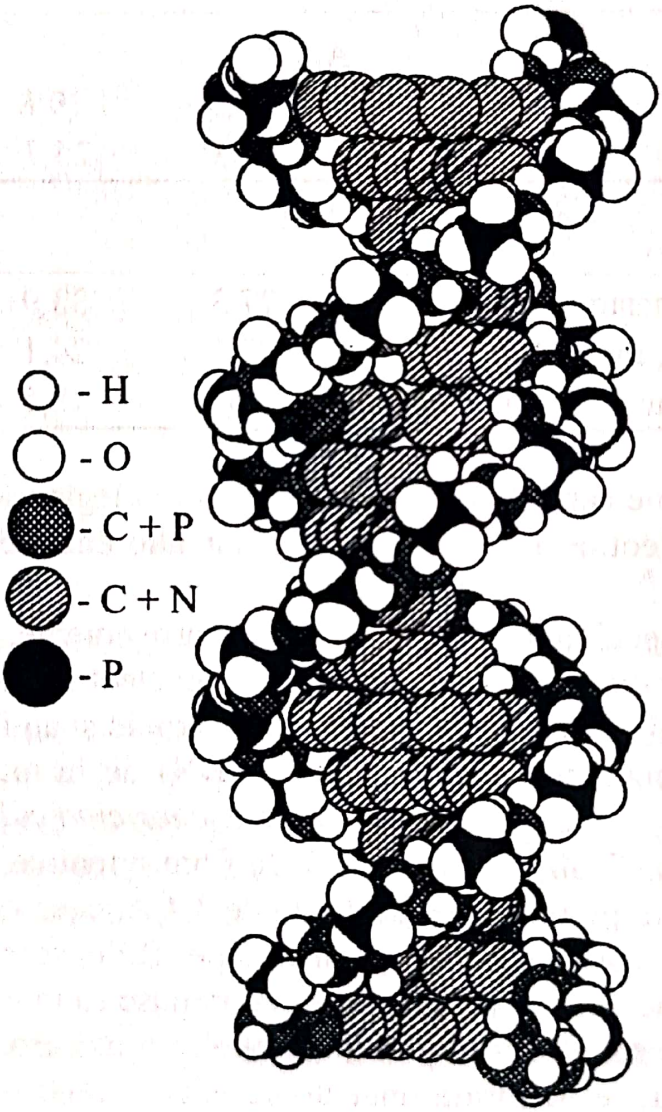


Fig. 7.4. Segment din molecula de ADN dublu helicoidală
(după Sager şi Ryan, 1963)
H = hidrogen, O = oxigen, C + P = carbonul şi fosforul din lanţul de esteri fosfatici, C + N = carbonul şi azotul din bazele purinice şi pirimidinice, P = fosfor (3)

Scanned with OKEN Scanner

Cele două catene antiparalele ale ADN-ului dublu helicoidale nu sunt identice în ceea ce privește secvența și compoziția bazelor pirimidinice și purinice și secvența nucleotidică, iar sensul de citire este de la 5' la 3' (fig. 7. 5.). Fiecare lanț polinucleotidic are o polaritate: la un capăt are hidroxilul din poziția 5' liber și la celălalt capăt are hidroxilul 3' liber. Cele două lanțuri polinucleotidice sunt antiparalele, adică un lanț are direcția 5'→ 3' și celălalt 3'→ 5' (fig. 7.5.).

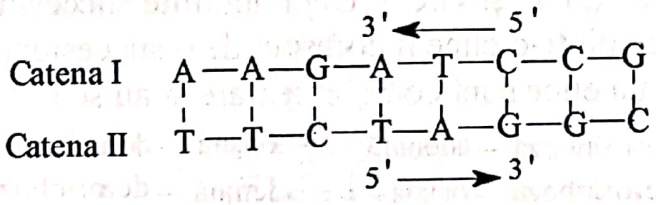


Fig. 7.5. Polaritatea catenelor de ADN

Secvența bazelor dintr-un lanț poartă informația genetică. La o anumită secvență a bazelor dintr-un lanț îi corespunde o secvență precisă a bazelor din celălalt lanț. De exemplu, la secvența TCCG corespunde, în lanțul opus, la AGGC.

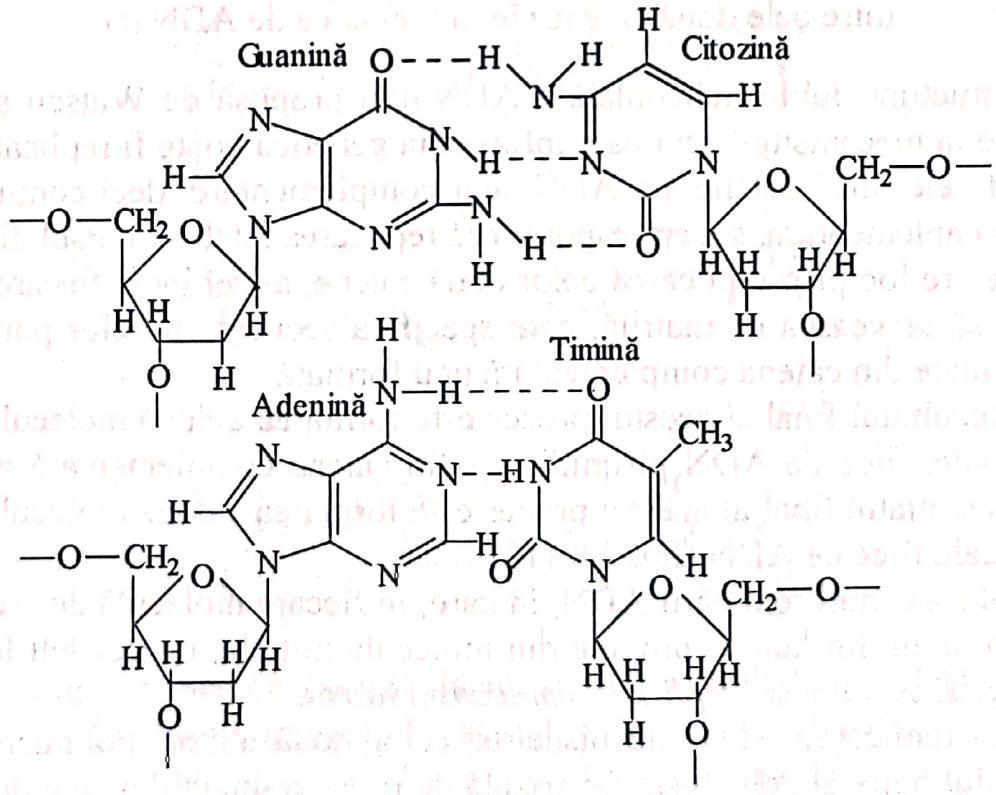


Fig. 7.6. Legăturile de hidrogen dintre bazele pirimidinice și purinice din două catene paralele de acizi nucleici

În modelul ADN din fig. 7.4., cele două elice sunt orientate cu resturile de purină şi pirimidină spre interior. Fiecare rest de purină stă în faţa unui rest de pirimidină şi sunt legate între ele prin legături de hidrogen [două legături de hidrogen între adenină (A) şi timină (T) şi trei legături de hidrogen între guanină (G) şi citozină (C)] (fig. 7.6. şi fig. 7.7.).

Unui rest de adenină (A) dintr-o elice îi corespunde, în elicea paralelă, unul de timină (T), iar unui rest de guanină (G), îi corespunde un rest de citozină (C). Perechile de resturi pirimidinice şi purinice ce se pot lega între ele sunt limitate la două (A.T. şi G.C.). Unei anumite succesiuni a resturilor pirimidinice şi purinice dintr-o elice îi corespunde o succesiune exact determinată în cealaltă, cele două elice sunt complementare şi au sens opus (fig. 7.6.).

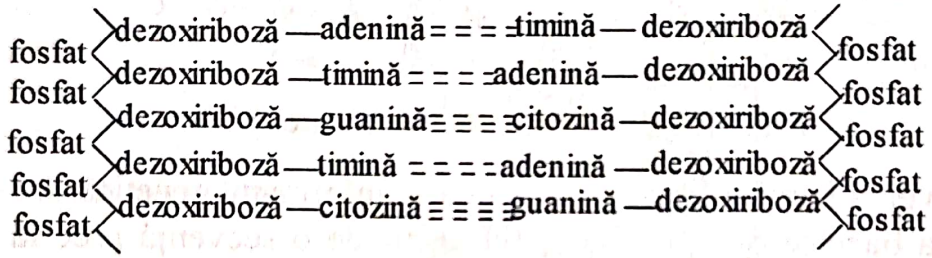


Fig. 7.7. Împachetarea resturilor de purine şi pirimidine între cele două catene ale dublei elice de ADN (2)

Structura dublu helicoidală a ADN-ului propusă de Watson şi Crick conduce la mecanismul prin care informaţia genetică poate fi replicată fidel. Întrucât cele două catene ale ADN sunt complementare, deci conţin informaţie complementară, s-a emis ipoteza că replicarea ADN în cursul diviziunii celulare are loc prin replicarea celor două catene, astfel încât fiecare catenă iniţială să servească ca matriţă, care specifică secvenţa bazelor purinice şi pirimidinice din catena complementară nou formată.

Rezultatul final al acestui proces este formarea a două molecule dublu helicoidale, fiice de ADN pirimidinice din catena complementară nou formată. Rezultatul final al acestui proces este formarea a două molecule dublu helicoidale fiice de ADN (fig. 7.8.) (3).

Mecanismul replicării ADN, în care, în fiecare moleculă de ADN nou formată, unul din lanţuri provine din molecula iniţială, iar celălalt lanţ este nou iniţiat, se numeşte *replicare semiconservativă.*

La replicarea ADN, dezrăsucirea celor două lanţuri polinucleotidice din dublul helix al ADN este favorizată de ruperea unuia din cele două lanţuri, riboză–fosfat, la o distanţă de circa 30Å de la locul în care nu s-a produs dezrăsucirea. Dezrăsucirea este uşurată şi de prezenţa unor proteine specifice de dezrăsucire care se leagă una după alta de ADN monocatenar.

Scanned with OKEN Scanner

Pe măsură ce are loc dezrăsucirea, pe fiecare din cele două lanțuri polinucleotidice se sintetizează un nou lanț cu o secvență complementară de nucleotide. ADN-ul nou sintetizat se formează ca fragmente mici, de circa 1 000 de nucleotide, care se leagă, apoi, între ele.

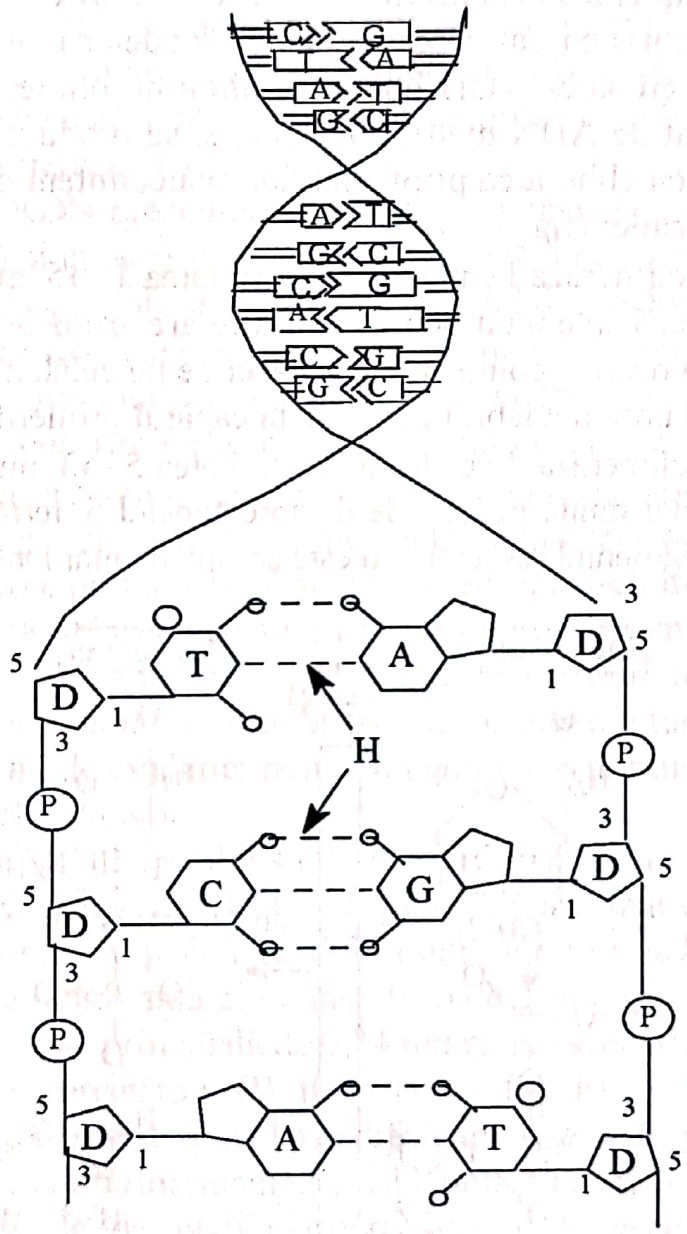


Fig. 7.8. Segment din molecula de ADN dublu helicoidală.
D = dezoxiriboza, P = acidul fosforic, A = adenina,
G = guanina, T = timina, C = citozina (3)

La biosinteza ADN intervin enzimele: *ARN – polimeraza*, trei *ADN – polimeraze* (*I, II* şi *III*) şi *ADN – ligaza.*

Scanned with OKEN Scanner

ARN – polimeraza sintetizează câte un fragment scurt de ARN (circa 100 de nucleotide) pe ambele lanțuri de ADN dezrăsucit, care servesc ca matriță. Rezultatul acțiunii ARN – polimerazei este un *primer* de ARN cu grupa 3' OH liberă, care este necesar pentru începerea sintezei ADN cu ajutorul ADN – polimerazelor (4).

ADN – polimeraza I catalizează trei reacții diferite:

a. Cuplarea pas cu pas a dezoxiribonucleotidelor la un primer de ADN sau ARN având gruparea 3'OH liberă. În afară de primer, este necesară și prezența unui lanț de ADN matriță. În reacție, se produce scindarea nucleozidtrifosfatului cu eliberarea pirofosfatului, concomitent cu legarea unității nucleozidice la primer (fig. 7.9.) (4).

b. ADN–polimeraza I catalizează activitatea 3'→5' exonucleazică prin care se îndepărtează câte un mononucleotid ce are grupă 3' OH liberă, în cazul în care acesta nu este complementar bazei de pe celălalt lanț. Se produce, astfel, corectarea unui nucleotid greșit de la capătul primerului.

c. ADN–polimeraza–I catalizează activitatea 5'→3' nucleazică prin care se îndepărtează mai multe nucleotide dinspre capătul 5' terminal dintr-un lanț de AND, dacă fragmentul respectiv nu este complementar lanțului matriță.

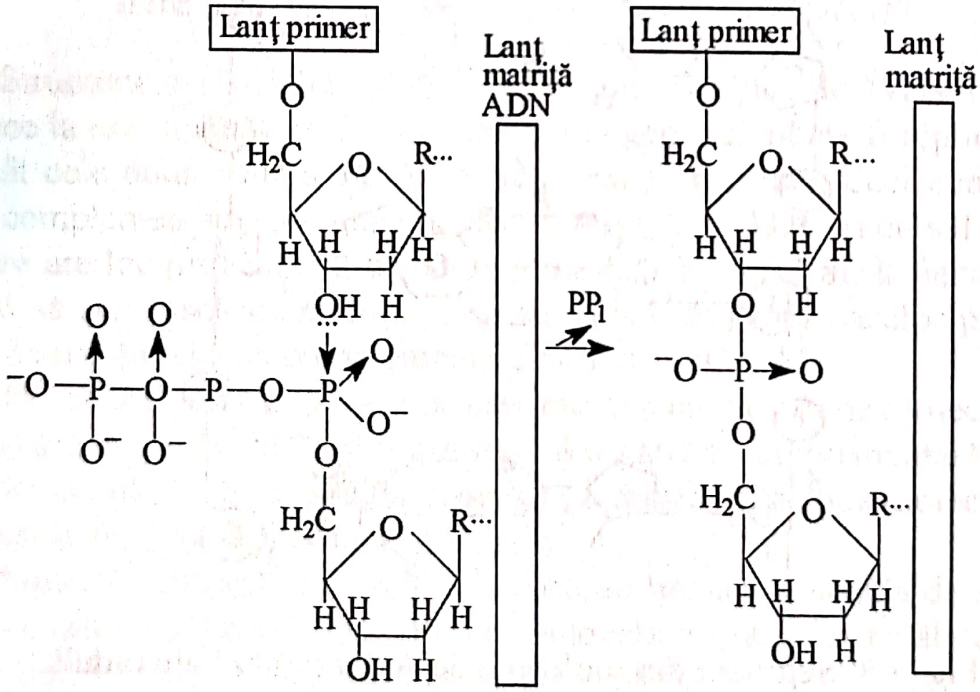


Fig. 7.9. Adaosul unui dezoxiribonucleotid la capătul unui primer de ADN și ARN pe matriță de ADN prin cataliza ADN – polimerazei (4)

ADN – polimerazele II și III nu catalizează activitatea 5'→3' nucleazică și au activitate optimă pentru o matriță de AND dublu helicoidală, în care nu sunt întreruperi prea mari.

ADN – polimeraza III are un rol esențial în biosinteza ADN.

ADN – ligaza catalizează formarea unei legături fosfodiesterice între două capete (unul cu OH în 3' și altul cu un fosfat în 5') ale unor fragmente de ADN.

Deci, biosinteza ADN începe cu dezrăsucirea celor două lanțuri din molecula de ADN parental, pe fiecare lanț, se sintetizează câte un primer de ARN, ca urmare a acțiunii ARN – polimerazei și în continuarea primerului de ARN se sintetizează lanțuri de AND complementare matriței prin acțiunea ADN–polimerazelor I, II și III.

Biosinteza ADN prezentată se referă la procariote și, cu unele deosebiri, este similară și la eucariote. Replicarea ADN la eucariote este semiconservativă, ca și la procariote și are loc în intervalul dintre diviziunile celulare.

Cromozomii de la eucariote conțin histone asociate cu ADN și, de aceea, se pare că, mai întâi, se separă de ADN și apoi începe replicarea. Replicarea ADN la eucariote este mult mai lentă decât la procariote (0,2 – 2 µm / min la eucariote față de 20 – 30 µm / min la procariote), dar are loc simultan în mii de puncte. ADN–polimerazele de la eucariote sunt diferite de cele de la procariote prin structură și proprietăți fizico-chimice.

Replicarea ADN trebuie să fie precisă pentru transmiterea fidelă a informației genetice la celulele fiice. Greșelile în procesul de replicare duc la apariția *unor celule mutante*. Celulele mutante într-o anumită limită pot fi benefice procesului de evoluție; peste un anumit nivel, mutațiile fac imposibilă supraviețuirea celulelor.

R. Franklin și H.F. Wilkins (1950 – 1953) au studiat, cu ajutorul difracției razelor X, structura ADN, ajungând la concluzia că ADN se poate obține în două forme A și B, care diferă între ele prin gradul de hidratare, forma B fiind cea importantă din punct de vedere biologic. Forma B posedă două periodicități, una principală de 0,34 nm și una secundară de 3,4 nm.

O serie de cercetători (Wilkins,1960; Landridge și colab., 1960; Marvin, 1965) au demonstrat, pe baza difracției razelor X, posibilitatea existenței a trei forme conformaționale a ADN, notate cu A, B și C, care se deosebesc printr-o serie de particularități fizice. De asemenea, Davies și Baldwin (1963) au arătat că ADN se prezintă ca o dublă elice de dreapta, cu un unghi de rotație de 45° și au numit-o forma D. În 1980, Rich și Itakure au evidențiat, prin difracția razelor X, existența unui ADN dublu helicoidal de stânga, având o formă neregulată, caracteristică conformației în zig-zag, pentru care au propus denumirea de ADN – z.

Pentru a explica periodicitatea de 0,34 nm, observată prin difracția razelor X, Watson și Crick au emis ipoteza că bazele pirimidinice și purinice sunt „stivuite" la o distanță de 0,34 nm, măsurată de la centrul uneia la centrul

Scanned with OKEN Scanner

celeilalte. Fiecare spiră a dublului helix conține exact 10 nucleotide, ceea ce corespunde cu distanța de 34 nm.

7.5.1. ADN VIRAL

Moleculele de *ADN viral* au masa moleculară mult mai mică decât ADN din celulele eucariote şi se pot obține cu uşurință în formă nativă omogenă. S-au cercetat, în mod deosebit, ADN–urile din bacteriofagii λ şi ΦX 174 ai E. coli. Primul este un ADN dublu helicoidal liniar, cu o masă moleculară de 32 milioane. Lungimea conturului său, determinat prin microelectronografie, este de 17,2 μm. ADN din virusul ΦX 174 este unul din cele mai mici ADN–uri cunoscute, este monocatenar, are formă circulară, cu lungimea conturului de 1,77 μm şi cu o masă moleculară de 1,7 milioane. Unele tipuri de ADN virale liniare nu conțin o secvență unică de baze purinice şi pirimidinice, fiind constituite din molecule ale căror secvențe sunt rezultatul unor permutații circulare.

La ADN-urile virale, unele dintre bazele lor pirimidinice şi purinice sunt modificate. Astfel, bacteriofagii T–par conțin hidroximetilcitozină în loc de citozină, iar gruparea hidroxil a hidroximetilcitozinei este uneori glicozilată.

7.5.2. ADN BACTERIAN

Moleculele de ADN din bacterii sunt de dimensiuni mari. Cromozomul de la E. coli se prezintă ca o moleculă foarte mare de ADN dublu helicoidal, cu greutatea moleculară de $2{,}8.10^9$ daltoni, o grosime de 2 nm şi o lungime a conturului de circa 1360 μm. ADN de la E. coli conține circa 4 milioane de perechi de nucleotide, fiecare pereche având o masă moleculară medie de 670.

Unele bacterii mai conțin, în afară de moleculele enorme de ADN din cromozomi, încă 1 până la 20 de molecule mici de ADN circular dublu helicoidal, cu dimensiuni de 5 – 100 megadaltoni, asemănătoare ADN-urilor virale.

7.5.3. CROMOZOMII EUCARIOTELOR

Cromozomii, structuri microscopice din celule, care conțin moleculele de acid dezoxiribonucleic (ADN), material ereditar, care influențează dezvoltarea şi caracteristicile fiecărui organism. La bacterii, cromozomii constau din simple spire de ADN, care plutesc libere în celule. La eucariote, cromo-

Scanned with OKEN Scanner

zomii se găsesc în nucleul celulei, au structuri mult mai complexe, iar forma moleculei de ADN este liniară (fig. 7.10.).

Fig. 7.10. Cromozom

Fiecare cromozom conține câte o moleculă foarte mare de ADN. Se ştiu mai puține informații referitoare la moleculele individuale de ADN din cromozomii celulelor organismelor superioare. La musculița de oțet *Drosophila*, cromozomul este o moleculă liniară de ADN dublu helicoidal, cu o lungime de circa 4 cm şi o masă moleculară de aproximativ 80.10^9. Molecula de ADN din cromozomul celulelor de mamifere conține $5{,}5.10^9$ perechi de baze pirimidinice şi purinice.

În celulele celor mai multe organisme care se reproduc sexual, cromozomii se găsesc în perechi. Un cromozom este moştenit de la femela mamă şi unul de la masculul tată. Ambii cromozomi ai fiecărei perechi conțin gene care corespund la aceleaşi caracteristici moştenite. Fiecare pereche de cromozomi este diferită de oricare altă pereche de cromozomi din aceeaşi celulă. Numărul perechilor de cromozomi din celulele diferitelor organisme se modifică în funcție de specie. Numărul caracteristic de cromozomi din celulele unui organism este cunoscut ca *număr diploid* (tabelul 7.3.) (2). Câinele, de exemplu, are 38 de perechi de cromozomi şi numărul diploid de 76, iar tomatele au 12 perechi de cromozomi şi numărul diploid de 24.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7.3.

Numărul de cromozomi diploizi la diferite specii

Procariote	
Bacterii	1
Eucariote	
Trifoi	14
Mazăre	14
Grâu	20
Om	46
Iepure	44
Pisică	38
Vulpe	34

Celulele sexuale (oul şi sperma) conţin numai jumătate din numărul de cromozomi găsiţi în alte celule ale organismului. Acest număr redus de cromozomi din celulele sexuale este cunoscut ca *număr haploid*. În timpul fertilizării, un ou şi un spermatozoid se unesc şi formează *celula zigot*, prima celulă a copilului. Zigotul conţine numărul diploid de cromozomi caracteristic speciei.

Celulele celor mai multe organisme au seturi complete de perechi cromozomale combinate. La mamifere, păsări şi la alte organisme, o pereche de cromozomi este absolut la fel. Cunoscută ca sex–cromozomi, această pereche joacă un rol dominant în determinarea sexului organismului. Cel feminin are două cópii de cromozomi X, în timp ce cel bărbătesc are un cromozom Y şi un cromozom X. Oamenii au 23 de perechi de cromozomi, cu un număr diploid de 46. Cel mai mare este cromozomul 1 şi cel mai mic este 23 (fig. 7.11.)

Organizarea ultrastructurală a ADN în interiorul nucleului celulelor eucariote este complexă, suferind schimbări însemnate în cursul ciclului celular. În interfază, perioada dintre mitoze, nucleii celulelor eucariote conţin o reţea neregulată de *fibre de cromatină* (denumirea de *cromatină* vine de acolo că aceste fibre se colorează în prezenţa coloranţilor bazici). Fibrele de cromatină, cu un diametru de circa 20 nm, sunt formate dintr-un ADN dublu helicoidal, strâns înconjurat de histone (proteine bazice), precum şi de proteine acide, enzime (ADN–polimeraza), ADN nuclear şi unele lipide. Grupări hidroxilice de la resturile de serină din structura histonelor sunt fosforilate enzimatic cu ajutorul *protein kinazei*. Moleculele de histone par a fi aranjate regulat în canelura mare a ADN dublu helicoidal. (fig. 7.4.).

Scanned with OKEN Scanner

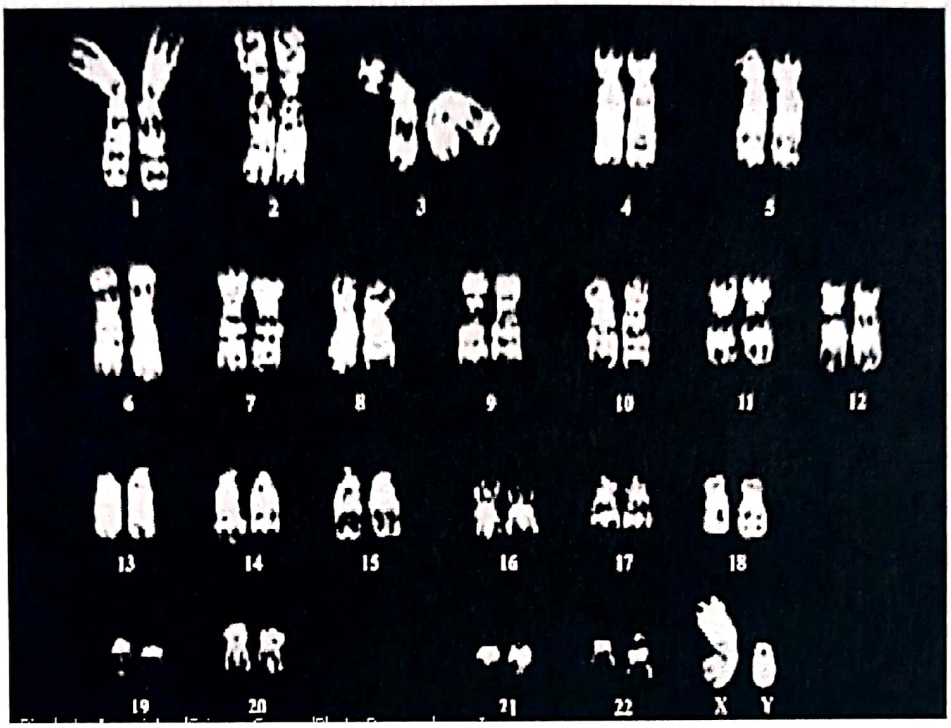


Fig. 7.11. Cele 23 de perechi de cromozomi
din nucleul celulei umane bărbăteşti

Sarcinile pozitive ale histonelor, care se repetă periodic, determină asocierea electrostatică a acestora cu grupările fosfat încărcate negativ ale ADN, ceea ce conferă o mai mare stabilitate şi flexibilitate moleculei de ADN. Helixul dublu de ADN, împreună cu histonele ascociate, este suprarăsucit şi pliat în fibrele de cromatină.

Mitocondria din celulele eucariote conţine ADN diferit de cel din nuclei. ADN mitocondrial este dublu catenar şi circular, are masa moleculară în jur de 10 milioane, compoziţia în baze purinice şi pirimidinice diferită de a ADN nuclear şi reprezintă mai puţin de 1% din cantitatea totală de ADN celular.

7.5.4. ROLUL GENETIC AL ADN

ADN este forma principală de stocare a informaţiei genetice în celule, care este înmagazinată şi transmisă celulelor fiice prin procesul de replicare.

La unele virusuri, informaţia genetică poate fi stocată şi în molecula de ARN şi, în acest caz, este transferată de la ARN la ADN, prin procesul de transcriere inversă.

ADN este purtătorul informaţiei genetice care se poate argumenta cu următoarele dovezi biochimice:

Scanned with OKEN Scanner

a. Cantitatea de ADN din orice specie de celulă sau organism este constantă şi nu poate fi modificată de factorii de mediu sau de schimbările în nutriţia sau metabolismul celulei.

b. Cantitatea de ADN pe celulă este direct proporţională cu gradul de complexitate a celulei şi deci cu cantitatea de informaţie genetică pe care o conţine (tabelul 7.4.). Bacteriile conţin aproximativ 0,01pg (1pg = 1.10^{-12}g) AND pe celulă, în timp ce ţesuturile animalelor superioare conţin 6 pg ADN pe celulă (2).

c. Molecula de ADN are o compoziţie în baze pirimidinice şi purinice diferită de la o specie la alta (tabelul 7.5.) (2).

d. În aproape toate moleculele de ADN, numărul resturilor de adenină este egal cu cel al resturilor de timină, iar numărul resturilor de guanină este egal cu cel al resturilor de citozină. Deci, suma resturilor purinice este egală cu suma resturilor pirimidinice, A + G = C + T.

e. Extractele de ADN din specii apropiate au compoziţii în baze pirimidinice şi purinice asemănătoare. ADN din diferitele ţesuturi ale aceleiaşi specii au aceeaşi compoziţie în baze pirimidinice şi purinice. Această compoziţie dintr-o specie nu este dependentă de vârstă, condiţii de nutriţie şi mediu.

Tabelul 7.4.

Conţinutul aproximativ de ADN a unor celule şi virusuri (2)

Specia	ADN pg / celulă sau virus	Numărul de perechi de nucleotide, milioane
Mamifere	6	5 500
Peşti	2	2 000
Reptile	5	4 500
Amfibieni	7	6 500
Păsări	2	2 000
Crustacee	3	2 800
Moluşte	1,2	1 100
Spongieri	0,1	100
Plante	2,5	2 300
Fungi	0,02 – 0,17	20
Bacterii	0,002 – 0,06	2
Bacteriofag T_4	0,00024	0,17
Bacteriofag λ	0,00008	0,05

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7.5. Compoziţia în baze pirimidinice şi purinice a ADN la diferitele specii (2)

Compoziţia în baze pirimidinice şi purinice, % mol					Raportul bazelor		Raportul de asimetrie
	A	G	C	T	A/T	G/C	$\frac{A+T}{G+C}$
Animale							
Om	30,9	19,9	19,8	29,4	1,05	1,00	1,52
Ovine	29,3	21,4	21,0	28,3	1,03	1,02	1,36
Păsări	28,8	20,5	21,5	29,2	1,02	0,95	1,35
Somon	29,7	20,8	20,4	29,1	1,02	1,02	1,43
Lăcustă	29,3	20,5	20,7	29,3	1,00	1,00	1,41
Plante							
Germene de grâu	27,3	22,7	22,8	27,1	1,01	1,00	1,19
Drojdii	31,3	18,7	17,1	32,9	0,95	1,09	1,79
Bacterii							
E. coli	24,7	26,0	25,7	23,6	1,04	1,01	0,93
Staphilococcus aureus	30,8	21,0	19,0	29,2	1,05	1,11	1,50
Clostridium perfiringens	36,9	14,0	12,8	36,3	1,01	1,09	2,70
Sarcina lutea	13,4	37,1	37,1	12,4	1,08	1,00	0,35
Bacteriofag T_7	26,0	24,0	24,0	26,0	1,00	1,00	1,08
Bacteriofag λ	21,0	28,6	27,2	22,9	0,92	1,05	0,79

7.5.5. PROPRIETĂŢILE ADN ÎN SOLUŢIE

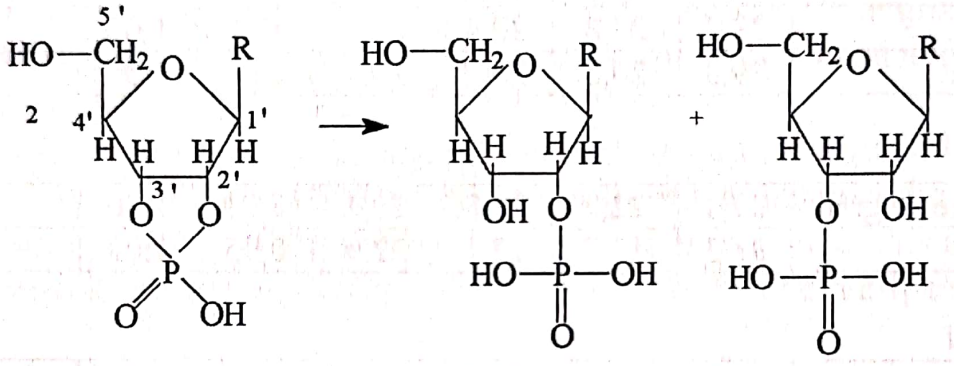
Grupările fosfat ale ADN, care formează punţi între mononucleozidele adiacente, au un pK' scăzut şi sunt în întregime ionizate la valori de pH mai mari de 4, ceea ce conferă moleculei de ADN un caracter puternic acid. De grupările fosfat se leagă puternic ioni bivalenţi, Ca^{2+}, Mg^{2+}, ca şi amine policationice, spermina [H_3N^+—$(CH_2)_3$—NH^2— $(CH_2)_4$—NH_2—$(CH_2)_3$—NH_3^+]; spermidina [H_3N^+—$(CH_2)_3$—NH_2—$(CH_2)_4$—NH_3], care, la unele bacterii şi virusuri, sunt asociate cu molecule de ADN. Aceste asocieri conferă moleculei de ADN stabilitate şi o mai mare flexibilitate. Stabilitatea legăturilor de

Scanned with OKEN Scanner

hidrogen între perechile de baze purinice şi pirimidinice este dependentă de pH şi este maximă între pH = 4 şi pH = 11.

ADN la pH = 3 este supus unei hidrolize blânde, când se eliberează toate bazele sale purinice, fără a se afecta legăturile pirimidin-dezoxiriboză sau legăturile fosfodiesterice din catena principală. Derivatul ADN, care a fost supus hidrolizei acide şi nu mai conţine purine, se numeşte *acid apurinic.*

Alcaliile diluate nu hidrolizează ADN, însă ARN este hidrolizat, datorită grupării hidroxil din poziţia 2'. Hidroxidul de sodiu, în soluţie diluată, hidrolizează ARN cu formarea unui amestec de nucleozid 2' şi 3'–fosfaţi. Mai întâi, se formează, la hidroliză, 2', 3'–ciclic–fosfaţii, care apoi sunt transformaţi în amestecul de 2' şi 3'–fosfaţi:



Acizii nucleici ingeraţi de animale sunt hidrolizaţi enzimatic în intestin de către nucleazele secretate de pancreas.

Punţile fosfodiesterice din ADN şi ARN sunt hidrolizate de două clase de enzime: *exonucleaze* şi *endonucleaze.*

Clasa exonucleazelor atacă lanţul polinucleotidic numai la capetele sale, la 3' şi 5', iar endonucleazele nu necesită grupări 3'– sau 5' – hidroxil libere; ele atacă anumite legături 3' sau 5' din interiorul lanţului polinucleotidic. Dintre exonucleaze, sunt binecunoscute *fosfodiesteraza din veninul de viperă* şi *fosfodiesteraza din splina de bovine.* Fosfodiesteraza din veninul de viperă hidrolizează toate legăturile 3' din ADN şi ARN, eliberând aproape toate nucleotidele sub formă de nucleozid 5'– fosfaţi. Enzima necesită o grupare 3'– hidroxil liberă la nucleotidul terminal şi acţionează în trepte, începând cu acel capăt al lanţului polinucleotidic. Fosfodiesteraza din splina de bovine hidrolizează toate legăturile 5' din ADN şi, deci, eliberează numai nucleozid 3' – fosfaţii.

Din clasa endonucleazelor, se menţionează *dezoxiribonucleaza I* din pancreasul de bovine, care catalizează hidroliza unor legături 3' din ADN cu formarea unor oligonucleotide şi *dezoxiribonucleaza II* izolată din splină, timus sau diferite bacterii şi hidrolizează unele legături 5'.

Soluţiile de ADN sunt foarte vâscoase datorită rigidităţii dublului helix, a lungimii foarte mari a moleculei de ADN şi a diametrului său mic.

Scanned with OKEN Scanner

Sub acțiunea unor factori fizici şi chimici, se produc modificări importante ale proprietăților fizice ale moleculelor de ADN când este dublu helicoidal. Are loc denaturarea moleculelor de ADN atunci când cele două catene ale dublului helix se derulează prin ruperea legăturilor necovalente şi apoi se separă fără ca legăturile covalente să fie afectate. Se produce ruperea legăturilor de hidrogen dintre perechile de baze purinice şi pirimidinice, precum şi a interacțiunilor dintre bazele succesive. Denaturarea moleculelor de ADN dublu helicoidale se poate produce sub influența valorilor scăzute de pH, prin creşterea puternică a temperaturii mediului, descreşterea constantei dielectrice a mediului apos, sub influența alcoolilor şi a cetonelor, expunerea la acțiunea ureei, amidelor etc. Datorită denaturării, vâscozitatea soluțiilor de ADN descreşte, rotația optică are valori mult mai negative, creşte absorbția luminii la 280 nm. Agenții de denaturare ai moleculelor de ADN dublu helicoidal sunt aceiaşi cu cei care produc denaturarea proteinelor globulare.

Denaturarea ADN dublu helicoidal este uşor reversibilă în condițiile în care efectul agentului de denaturare încetează şi dacă procesul de derulare a celor două catene nu a avut loc complet şi a rămas cel puțin un segment scurt dublu helicoidal, în care bazele purinice şi pirimidinice au continuat să formeze perechi. La denaturare, segmentele din molecula de ADN, cele mai puțin stabile, sunt cele mai bogate în perechi de adenină – timină care se desfac primele.

7.6. ACIDUL RIBONUCLEIC (ARN)

Acidul ribonucleic (ARN) se găseşte în celule, sub forma a trei tipuri majore: ARN mesager (ARNm), ARN de transfer (ARNt) şi ARN ribozomal (ARNr). Toate cele trei tipuri de ARN sunt monocatenare şi se deosebesc între ele prin masa moleculară, coeficientul de sedimentare (tabelul 7.6.) (2) şi prin rolul bine definit biologic (7, 8).

Fiecare din cele trei tipuri de ARN există în forme moleculare diferite. ARNm există în sute şi chiar mii de forme distincte, ARNt există în 60 de forme şi ARNr există în cel puțin trei forme distincte (9, 10, 11).

S-a arătat că acidul ribonucleic (ARN) se găseşte, mai ales, în citoplasmă şi în cantitate mică în nuclee. În citoplasmă, ARN se întâlneşte în formă solubilă, cu masă moleculară mică, şi în formă insolubilă, cu masă moleculară mare. Forma insolubilă de ARN este localizată în ribozomi, unde este sediul sintezei proteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7.6.

Unele proprietăţi ale ARN din *Escherichia coli* (2)

Tipul	Coeficientul de sedimentare (S)	Masa moleculară	Numărul de resturi nucleotide	Procent faţă de ARN total
ARNm	6 – 25	25 000 – 1 000 000	75 – 3 000	2
ARNt	≈ 4	23 000 – 30 000	75 – 90	16
ARNr	5	≈ 35 000	≈ 100	82
	16	≈ 550 000	≈ 1 500	82
	23	≈ 1 100 000	≈ 3	82

În acidul ribonucleic (ARN), sunt două baze pirimidinice, citozina (C) şi uracilul (U), uracilul înlocuind timina (T) care se găseşte în ADN şi două baze purinice, adenina (A) şi guanina (G), ca şi în ADN. Proporţia dintre bazele purinice şi pirimidinice şi succesiunea lor în catenă diferă între diferitele ţesuturi ale aceluiaşi animal, dar ţesuturile similare ale unor animale diferite au o compoziţie asemănătoare.

6.6.1. ACIDUL RIBONUCLEIC MESAGER (ARNm)

Moleculele de ARN care poartă informaţia genetică pentru biosinteza proteinelor se numesc ARN – mesager (ARNm). Celelalte două forme de ARN, care au roluri bine definite în biosinteza proteinelor, sunt, aşa cum s-a mai spus, ARN de transfer (ARNt) şi ARN ribozomal (ARNr). ARNt transportă la ribozomi aminoacizii într-o formă activată, pentru formarea legăturilor peptidice în secvenţa dictată de matriţa de ARNm. Există minimum un ARNt pentru fiecare aminoacid. ARNr este o componentă a ribozomilor cu un rol în biosinteza proteinelor (12, 13, 14).

Acidul ribonucleic mesager (ARNm) conţine numai cele patru baze majore (adenina, guanina, citozina şi uracilul). El se sintetizează în nucleele celulelor în procesul de transcripţie, când secvenţa bazelor dintr-un lanţ de ADN cromozomal este copiată enzimatic în lanţul de ARNm. O anumită cantitate de ARNm este sintetizată şi în mitocondrii. După transcripţie, ARNm trece în citoplasmă şi apoi la ribozomi, unde are rol de matriţă la ordonarea secvenţială a aminoacizilor în procesul de biosinteză a proteinelor. ARNm mitocondrial este în cantitate mică, dar el se află în foarte multe forme distincte, care se deosebesc prin masa moleculară şi secvenţa bazelor

Scanned with OKEN Scanner

purinice şi pirimidinice. Fiecare proteină sintetizată în celulă este codificată de către un ARNm sau o secvenţă specifică de ARNm.

ARNm din celulele eucariote au la capătul 3' terminal o secvenţă de circa 200 de radicali adeninici, care se pare că are un rol în prelucrarea sau transportul ARNm de la nucleu la ribozomi (2).

ARNm este sintetizat pe matriţa de ADN şi are o secvenţă a bazelor purinice şi pirimidinice complementară AND-ului matriţă (15, 16).

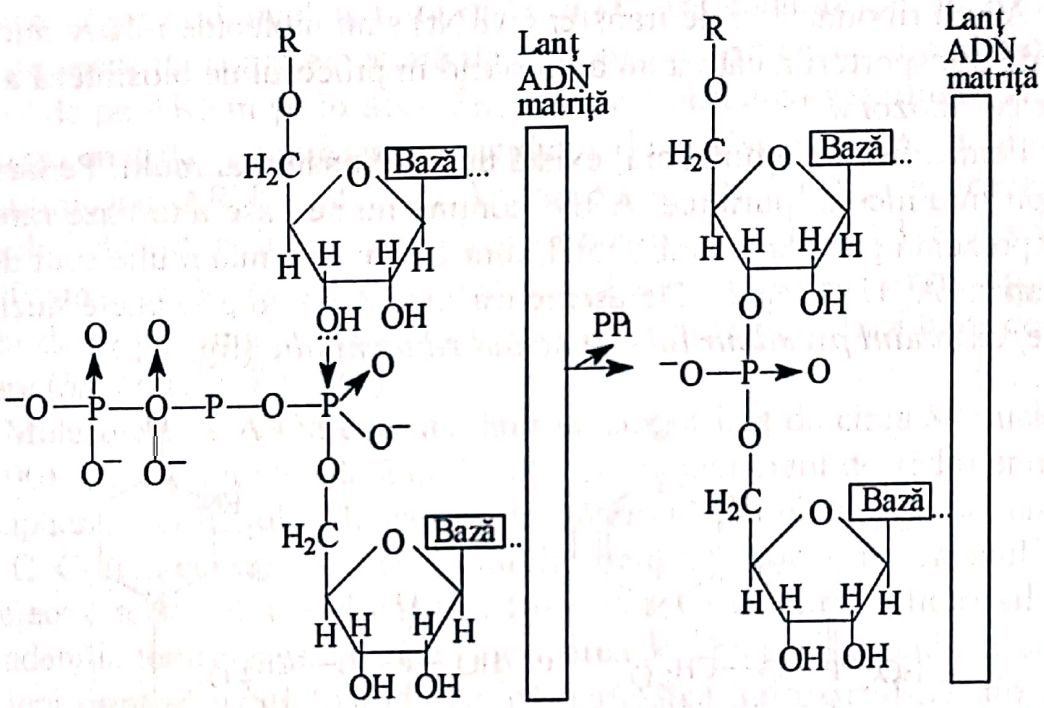


Fig. 7.12. Reacţie catalizată de ARN polimerază (4)

Mecanismul molecular al biosintezei ARNm pe matriţa de ADN este asemănător pentru toate tipurile de ARN. Sinteza ARN pe matriţa ADN este catalizată de enzima ARN–polimeraza–ADN–transcriptaza şi sunt necesare următoarele componente:

– matriţa AND dublu helicoidal;

– ribonucleozid–trifosfaţii (precursori activi: ATP, GTP, UTP, CTP);

– Mg^{2+} sau alte metale bivalente.

Sinteza ARN este în direcţia 5'→3' (antiparalelă lanţului matriţă de ADN), iar mecanismul de alungire a lanţului este asemănător cu a ADN, producându-se eliberarea acidului pirofosforic din ribonucleozid–trifosfat. Acidul piro-fosforic este hidrolizat apoi, cu eliberare de energie (fig. 7.12.) (4).

Biosinteza ARN diferă de biosinteza ADN prin:

- matriţa ADN este păstrată în sinteza ARN, fiind semiconservată numai în sinteza ADN;
- ARN – polimeraza nu necesită un primer.

7.6.2. ACIDUL RIBONUCLEIC DE TRANSFER (ARNt)

Acizii ribonucleici de transfer (ARNt) sunt molecule relativ mici şi au rolul de transportori a câte unui aminoacid în procesul de biosinteză a proteinelor pe ribozomi.

Pentru fiecare aminoacid, există un ARNt sau mai mulţi. Pe lângă bazele pirimidinice şi purinice, ARNt conţine numeroase alte baze rare, care pot reprezenta până la 1 % din total, dintre care cele mai multe sunt derivaţi metilaţi ai A, U, C, şi G. De asemenea, ARNt conţine şi unele nucleotide aparte, ca *acidul pseudouridilic* şi *acidul ribotimidilic* (fig. 7.13.).

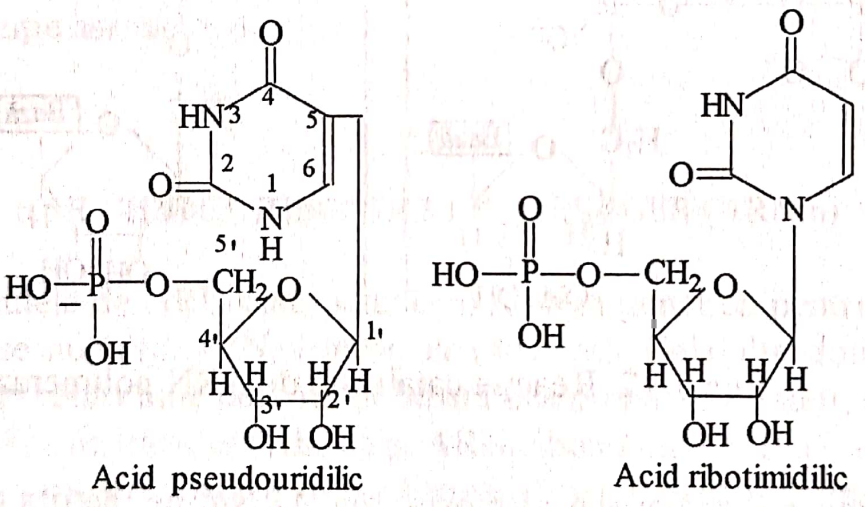


Fig. 7.13. Nucleotide neobişnuite găsite în ARNt

La acidul pseudouridilic, legătura dintre bază şi pentoză se face în poziţia 5 a uracilului şi nu în poziţia 1. La acidul ribotimidilic, timina se află la ARN şi nu la ADN, cum este obişnuit.

ARN este matriţa pe care se aranjează aminoacizii în secvenţa în care intră în lanţul polipeptidic, etapă a procesului de biosinteză a proteinelor. Dar, aşa cum a arătat F.H.C. Crick (1958), ARNm nu poate oferi afinitatea specifică legării aminoacizilor, deoarece bazele purinice şi pirimidinece din ARNm nu pot stabili legături de hidrogen şi, în consecinţă, au o comportare hidrofobă faţă de cei 20 de aminoacizi care au resturi laterale foarte diferite. Crick a sugerat că aminoacizii sunt transportaţi la ARNm de nişte molecule

Scanned with OKEN Scanner

adaptor care, pe de o parte, se leagă specific de câte un aminoacid şi, pe de altă parte, se leagă specific de ARNm. Aceste molecule care produc racordarea aminoacizilor la ARNm s-au dovedit a fi tot specii de ARN, care s-au numit ARN de transfer (ARNt). ARNt a fost numit de unii autori ARN solubil, ARNs, datorită solubilităţii sale mari în mediu acid. Fiecare moleculă de ARNt are un capăt de legare a aminoacidului şi un capăt de recunoaştere a matriţei de ARNm.

Locul de recunoaştere a matriţei de ARNm este reprezentat de trei baze (purinice şi pirimidinice) numită *anticodon*. Anticodonul de pe ARNt recunoaşte secvenţa complementară de trei baze (purinice şi pirimidinice) din *codonul* de pe ARNm şi, în acest fel, are loc racordarea specifică a aminoacidului de matriţă. Legarea aminoacidului de ARNt este catalizată de enzime aminoacil–ARNt–sintetaze. Aminoacidul este legat prin gruparea sa carboxilică de hidroxilul din poziţia 3' a ribozei de la capătul 3' al ARNt.

Toate speciile de ARNt au o structură asemănătoare: patru regiuni cu perechi de baze complementare (*tulpini*) şi patru regiuni fără baze complementare (*bucle*) (fig. 7.14) (4).

Moleculele de ARNt constau dintr-un singur lanţ de circa 80 nucleotide (73 – 90), cu masa moleculară de 25 000 şi un coeficient de sedimentare de 4S. Capătul 3' al lanţului de care se leagă aminoacidul transportat are secvenţa C–C–A (acid citidilic–acid citidilic–acid adenilic), iar capătul 5' are ca nucleotid terminal acidul guanilic fosforilat. Gruparea 5' – hidroxil a acidului adenilic terminal este legată la gruparea 3' – hidroxil a acidului citidilic precedent printr-o punte fosfodiesterică. Gruparea hidroxil liberă din acidul adenilic terminal este acilată enzimatic cu α–aminoacidul specific, formând aminoacil–ARNt. Acest aminoacid este transferat enzimatic la capătul lanţului polipeptidic în curs de formare de la suprafaţa ribozomilor, în procesul de biosinteză a proteinelor (2).

S–au evidenţiat secvenţe complementare ale nucleotidelor în anumite porţii ale lanţului polinucleotidic, în care se stabilesc legături de hidrogen, ca şi între perechile de baze din ADN. Formarea acestor legături de hidrogen, determină o pliere a lanţului, ce poate fi sub formă de trifoi cu patru foi. În figura 7.14., există patru regiuni cu baze complementare (tulpini) şi patru fără perechi de baze (bucle). Bucla D conţine dihidrouracil, bucla T conţine timină, bucla a treia conţine o secvenţă de trei baze care formează anticodonul şi bucla a patra are 4 – 5 nucleotide şi uneori mai multe, până la 21. În celelalte bucle sunt secvenţe constante de nucleotide. În tulpina acceptoare de aminoacid (fig. 7.14.), sunt 7 perechi de baze, în tulpina T, 5, în tulpina anticodonului, 5 şi în tulpina D, 4 (4). Formarea legăturilor de hidrogen între bazele complementare din cele patru tulpini duce la structuri de dublu helix,

Scanned with OKEN Scanner

care dă moleculei o mare stabilitate. De remarcat că ARNt are o formă globulară, spre deosebire de ARNm sau ADN.

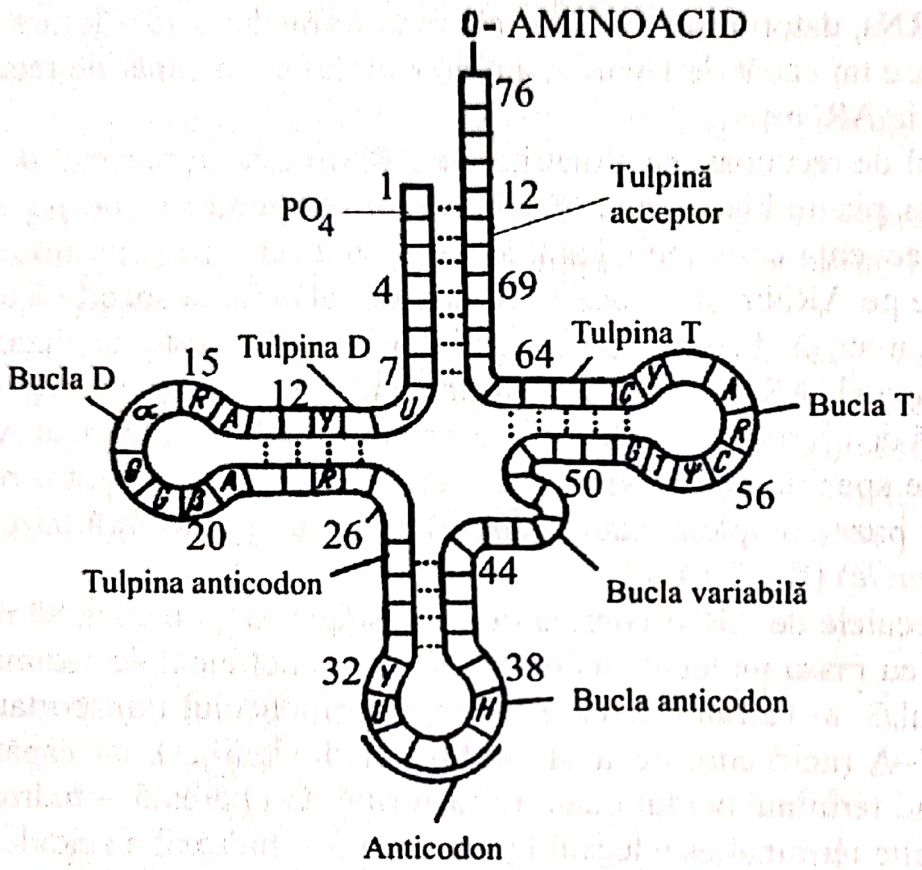


Fig. 7.14. Schiţa de pliere a lanţului ARNt cu formarea celor patru tulpini şi patru bucle (4)

Funcţia principală a ARNt este de a lega specific aminoacizii liberi din citoplasmă şi de a-i transporta în ribozomi, asigurând legarea lor în lanţul polipeptidic în secvenţa dictată de ARNm, reacţie catalizată de *aminoacil – ARNt – sintetaza.*

7.6.3. ACIDUL RIBONUCLEIC RIBOZOMAL (ARNr)

Acidul ribonucleic ribozomal (ARNr) reprezintă 65% din masa ribozomilor. În ribozomii de *Escherichia coli* (celule procariote), se găsesc sub formă de molecule liniare monocatenare, în trei forme, cu coeficienţi de sedimentare de 23S, 16S şi 5S şi se deosebesc prin secvenţa şi raportul bazelor. În celulele eucariote, sunt patru tipuri de ARNr, cu coeficienţi de sedimentare:

28S, 18S, 7S şi 5S. Deşi ARNr reprezintă cea mai mare parte din ARN celular, funcţia lui în ribozomi nu este bine lămurită.

7.6.4. RIBOZOMII

Ribozomii sunt particule ribonucleoproteice, esenţiali în sinteza proteinelor şi se găsesc în toate tipurile de celule (5). În afară de ARN, ei nu conţin decât proteine.

Ribozomii celulelor procariote au un diametru de circa 18 nm, o masă de circa 2,8 megadaltoni şi un coeficient de sedimentare de 70 S; ei conţin 60 – 65 % ARN şi 35 – 40 % proteine. O celulă de E. coli conţine circa 15 000 ribozomi, care reprezintă aproximativ 25 % din substanţa uscată a celulei (2).

Ribozomii celulelor eucariote sunt mai mari şi au un diametru de 20 – 22 nm, o masă a particulei de 40 megadaltoni şi un coeficient de sedimentare de 73 – 80 S. În celulele eucariote, ribozomii se găsesc şi în mitocondrii şi în cloroplaste.

În celulele procariote, ca şi în cele eucariote, mulţi ribozomi sunt asociaţi în şiruri numite *poliribozomi* sau *polizomi*, ataşaţi pe o moleculă de ARNm în timpul sintezei proteice. Ribozomii din celulele eucariote conţin molecule de ARNr mai mari şi mai multe lanţuri polipeptidice decât cei din celulele procariote. Proteinele ribozomale sunt insolubile în apă la pH = 7,0 şi pot fi extrase selectiv, pe rând, cu soluţii saline concentrate. Ribozomul prezintă locuri de legare pentru un număr de proteine ribozomale. Probabil, ARNr şi diferitele tipuri de proteine, constituite din agregate moleculare pentru a forma subunităţi 30 S şi 50 S ale ribozomului 70 S, participă la modificări conformaţionale, pentru a deplasa ribozomul cu lanţul său polipeptidic crescând, de-a lungul ARNm. Ribozomii pot fi socotiţi ca sisteme mecanochimice şi trecuţi în aceeaşi clasă de biostructuri, ca şi *actomiozina* din muşchi şi microtubulul flagelilor de la eucariote (2). Ribozomii sunt stabili în soluţii de concentraţii relativ mari de Mg^{2+}, iar atunci când concentraţia soluţiilor scade, ribozomii se pot disocia în subunităţi.

7.6.5. VIRUSURILE

Virusurile, care au fost denumite „structuri de la marginea vieţii", sunt particule comune constituite, în principal, din acid nucleic şi un număr de substanţe proteice specifice; acestea au capacitatea de a se autoreplica atunci când intră într-o celulă gazdă specifică. Virusurile infectează celulele animale,

Scanned with OKEN Scanner

vegetale şi bacteriene. Particulele de virus *„virionii"* au capacitatea de a se ataşa la suprafaţa unor celule gazdă specifice şi eliberează în citoplasmă acidul lor nucleic, care reprezintă partea infecţioasă a virusului.

Numeroase virusuri care parazitează pe plante sau animale pot fi obţinute în stare cristalină fără a-şi pierde virulenţa. Faptul că virusurile generează procese de infecţie, iar unele şi de contagiune, la fel ca bacteriile patogene şi faptul că posedă însuşirea de a se încrucişa şi recombina, constituie criterii pentru integrarea virusurilor în lumea organismelor vii, cu toate că nu au organizare celulară, singura capabilă să întreţină viaţa. Virusurile posedă principalele caracteristici ale vieţii: metabolismul, creşterea, reproducerea şi mutabilitatea, care implică şi evoluţia. De asemenea, particula virală prezintă complexitate morfologică şi fiziologică, probabilitatea existenţei la unele virusuri a unei formaţii nucleare simple şi, mai ales, prezenţa acizilor nucleici, care constituie izvorul proceselor vitale. Toate acestea duc la concluzia că virusurile pot fi considerate cele mai simple forme de viaţă (3). Virusurile sunt foarte variate în ceea ce priveşte greutatea, forma, compoziţia chimică (tabelul 7.7.) (2).

Tabelul 7.7.

Caracteristici ale unor viruşi (2)

	Greutatea virusului (megadaltoni)	Acizii nucleici	Număr de lanţuri	Acid nucleic (%)	Forma	Axa mare (nm)
Virusurile bacteriilor (Bacteriofagi)						
T_2, T_4, T_6	≈220	ADN	2	61	Mormoloc	18
T_7	38	ADN	2	41	Mormoloc	6
φ N 174	6	ADN	1 sau 2	26	Poliedral	15
λ	50	ADN	2	64	Mormoloc	20
M 52	3,6	ARN	1	32	Poliedral	17,5
Virusuri vegetale						
Mozaicul tutunului	40	ARN	1	5	Bară	300
Virus al tomatelor	10,6	ARN	1	15	Poliedral	28
Necroza tutunului	1,97	ARN	1	20	Poliedral	21

Scanned with OKEN Scanner

Spre deosebire de celule, virusurile conţin numai ADN sau numai ARN.

ADN din virusurile care conţin ADN, după ce a intrat în celula gazdă, serveşte ca matriţă pentru transcripţia moleculelor complementare de ARNm, care vor determina aparatul ribozomal al gazdei să sintetizeze proteine virale şi enzimele necesare pentru sinteza ADN viral.

ARN din virusurile care conţin ARN, se leagă de ribozomii gazdei, în detrimentul ARNm gazdă şi funcţionează ca matriţă pentru sinteza proteinelor virale şi a enzimelor necesare pentru replicarea ARN viral. În unele cazuri, ARN viral determină sinteza unui ADN care codifică sinteza unor proteine virale (2).

7.7. ACŢIUNEA ŞI INTERACŢIUNEA GENELOR

Trăsăturile fundamentale ale fiinţelor vii sunt organizarea celulară, metabolismul, autoconservarea, reactivitatea, creşterea, reproducerea, mutabilitatea şi evoluţia. Fac excepţie de la organizarea celulară virusurile, care au o organizare necelulară, adeseori sunt lipsite de membrană; la majoritatea virusurilor, este imposibil de pus în evidenţă existenţa nucleului şi au dimensiuni foarte mici (10 – 500 mμ) (4).

Toate celulele, de la celulele specializate ale organismului, incluzând acelea ale pielii, muşchilor, oaselor, din ficat şi creier derivă de la copia identică a singurei celule ou fertilizate. Fiecare din aceste celule au exact acelaşi ADN ca şi celula originală, chiar dacă au mari diferenţe la înfăţişare şi funcţii. Genele dictează cum aceste celule se specializează. S-au dezvoltat o serie de metode biochimice şi genetice în care ADN poate fi separat, rearanjat şi transferat de la o celulă la alta. Unele din aceste metode de laborator servesc şi la studiul proprietăţilor genelor. Moleculele de ADN de la toate formele de viaţă au aceeaşi structură şi aceleaşi patru baze (purinice şi pirimidinice). Pe baza acestor analogii, una sau mai multe gene dintr-un organism s-au introdus în al doilea organism. Noile gene, uneori numite *ADN străin*, ajung funcţionale în organismul secund şi produc proteinele dorite. Se foloseşte aşa-numitul *ADN recombinant* pentru a se obţine, de exemplu, o cantitate mare de proteine asemenea insulinei.

Primul pas în crearea insulinei utilizând ADN recombinant este izolarea secvenţei de nucleotide din ADN al celulei umane care formează genele pentru insulină. Se folosesc enzime specifice, cu care se scindează lanţul dublu de ADN în punctul în care genele de insulină acţionează. ADN izolat poate fi recombinat sau îmbinat cap la cap cu *un vector*, fragment de ADN care este capabil să transporte genele de la un organism la altul. Vector

Scanned with OKEN Scanner

poate fi un *plasmid*, mici fragmente circulare de ADN ce se găsesc în bacterii, bacteriofagi, virusuri, care sunt paraziți ai bacteriilor. Introducând vectorul care conține genele insulinei în bacterii, asemenea *E. coli*, în cinci ore, o singură *E. coli* reproduce sute de copii a genelor producătoare de insulină. Acest proces duce la crearea multor celule cu ADN identice cu cel introdus.

Plasmidul constă din molecule în formă de spirală de ADN în afara cromozomilor. El este prezent în aproape toate bacteriile şi poate, de asemenea, fi găsit în fungi, protozoare, chiar în unele plante şi animale. Plasmidele au mai puține gene decât ADN din cromozomi.

Caracteristicile de bază ale ființelor vii sunt condiționate de materialul genetic localizat în cromozomi. La procariote (virusuri, alge albastre), se întâlneşte, de obicei, un singur cromozom, care poartă denumirea de *genofor*. Genoforul are o structură foarte simplă, se găseşte într-o capsulă numită *nucleoid*, fără membrană şi diviziunea acestuia se face vegetativ prin schizotomie. La eucariote, cromozomii sunt situați în nucleul celular, au o structură complexă, se găsesc cel puțin doi şi sunt supuşi diviziunii mitotice şi meiotice.

Componenta chimică de bază a cromozomilor de la eucariote şi procariote este acidul dezoxiribonucleic (ADN) care constituie materialul genetic. La numeroase virusuri ADN, este înlocuit cu acidul ribonucleic (ARN).

ADN cromozomal constituie substratul material al eredității. El guvernează activitățile specifice ale celulei şi participă direct la biosinteza proteinelor. Prin secvența specifică a nucleozidelor, ADN cuprinde întreaga cantitate de informație genetică (mesajul genetic) prin care se transmit caracterele unui individ. Transferarea informației genetice de la ADN la sinteza proteinelor şi la realizarea caracterelor, are loc prin intermediul următoarelor procese: *autoreplicarea moleculei de ADN, transcripția genetică şi translația genetică.*

Autoreplicarea moleculei de ADN se face prin separarea celor două catene şi formarea de catene complementare, aşa cum s-a arătat mai sus.

Sinteza ADN cuprinde următoarele procese: formarea dezoxiribonucleozidelor, transformarea acestora în dezoxiribonucleotizi trifosfați, unirea dezoxiribonucleotizilor trifosfați prin legături de hidrogen cu dezoxiribonucleotizii din catena de ADN care serveşte ca matriță, formarea de legături 3', 5' – monofosfodiesterice între dezoxiribonucleotizii succesivi în prezența ADN – polimerazei (3).

Transcripția genetică sau *transferarea mesajului genetic* din moleculele de ADN în moleculele de ARN se realizează printr-un proces de heterocataliză, în care ARN – polimeraza serveşte ca enzimă activantă, iar una din catenele de ADN îndeplineşte funcția de matriță pentru sinteza de structuri monocatenare de ARN complementare catenei de ADN care a servit ca ti-

Scanned with OKEN Scanner

par. ARN sintetizat se numeşte ARN mesager (ARNm). El înmagazinează mesajul genetic din ADN şi serveşte, la rândul său, ca matriţă pentru sinteza proteinelor. ADN serveşte ca matriţă şi pentru sinteza ARNt şi ARNr.

Translaţia genetică reprezintă traducerea mesajului genetic cuprins în moleculele de ARNm într-o secvenţă de acizi aminici, formarea legăturilor peptidice, a polipeptidelor şi, în final, sinteza proteinelor. În acest proces complex, mai participă ARNt, ARNr şi o serie de enzime activatoare. La virusurile care nu au ADN în constituţia lor, informaţia genetică este înmagazinată în ARN viral, care este monocatenar, ca şi ARN celular. Autoreplicarea acestuia se face pe baza unei matriţe proprii şi nu pe baza unei matriţe de ADN, ca în cazul ARN celular.

ARN viral îndeplineşte funcţia de sinteză a proteinelor, cât şi cea de transmitere a informaţiei genetice de la o generaţie la alta.

Unităţile din molecula de ADN sau din ARN viral, care conţin materialul genetic şi, deci, reprezintă suportul material al informaţiei genetice sunt *genele.*

Gena este unitatea elementară a ereditătii şi este o unitate funcţională din molecula de ADN sau ARN viral, formată dintr-o succesiune anumită de nucleotide care determină sinteza unei anumite proteine.

Genele apărute prin modificarea *genelor normale*, care, de regulă, sunt predominante, se numesc *gene mutante*. Ca rezultat al procesului de mutaţie, una şi aceeaşi genă poate apărea sub mai multe forme, cunoscute sub denumirea de *alele*. În cazul în care gena a suferit mai multe procese mutaţionale, se formează aşa-zisele *gene polialele*.

Pentru a evalua materialul genetic, se menţionează numai că în nucleul eucariotelor, se găsesc cel puţin doi cromozomi şi un cromozom conţine mai multe molecule de ADN, iar o moleculă de ADN conţine mai multe gene şi o genă are circa 500 – 2 000 de subunităţi de recombinare (*reconi*) sau subunităţi de mutaţie (*mutoni).* Cum unele cercetări arată că un recon, respectiv un muton poate avea un număr mai mare de perechi de nucleotide, de exemplu, 2 la Bacteriofagul T_4, 10 la *Escherichia coli*, 100 la *Neurospora*, reiese că numărul perechilor de nucleotide dintr-o genă este de ordinul zecilor de mii şi chiar sutelor de mii. Din punct de vedere structural, gena poate fi subdivizată până la nivelul nucleotidei, dar, din punct de vedere funcţional, gena constituie o unitate bine definită (3).

Genele sunt centre de activitate biologică situate liniar de-a lungul macromoleculei de ADN, care controlează toate reacţiile biochimice şi procesele fiziologice din organism şi, implicit, formarea caracterelor individuale. Având capacitatea de autoreproducere fidelă, genele asigură stabilitatea în-

Scanned with OKEN Scanner

suşirilor nenumăratelor forme de plante şi animale şi perpetuarea acestora de-a lungul miilor de generaţii (3).

Organizarea structurală a macromoleculelor de ADN şi, deci, a genelor, reprezintă forma cea mai înaltă de organizare a materiei vii (3). Principalele însuşiri ale fiinţelor vii sunt codificate în gene şi poartă amprenta acţiunii acestora. În numeroase cazuri, genele acţionează asupra *fenotipului*, care este ansamblul de proprietăţi şi de caractere acumulate în procesul dezvoltării individuale a organismului, în strânsă legătură cu alte gene.

Genele constituie substratul material al vieţii, fiind generatoare ale tuturor fenomenelor vitale. Acestea transmit însuşirile fundamentale ale materiei vii şi caracterele individuale. Genele constituie izvorul vieţii şi asigură permanentizarea acesteia în cursul dezvoltării speciilor (3).

Gena poate fi definită ca un segment al macromoleculei de ADN sau ARN, în cazul unor virusuri, format dintr-o secvenţă anumită de nucleotide, care acţionează ca o unitate funcţională şi care conţine informaţia genetică ce determină secvenţa nucleotidelor într-o moleculă de ARNm (transcripţia genetică) şi, respectiv, a aminoacizilor într-o catenă polipeptidică (translaţia genetică).

Genomul este ansamblul de gene ce se găsesc în cromozomii unei specii.

Genomul uman este compus din 50 000 – 100 000 de gene localizate în 23 de perechi de cromozomi dintr-o celulă umană. Un singur cromozom poate conţine mai mult de 250 milioane de ADN şi se estimează că întregul genom uman constă din 3 miliarde de ADN.

S. Benzer a dovedit că fiecare genă conţine mai multe situri mutabile. Mutaţia poate implica o schimbare chimică într-un singur nucleotid (mutaţia punctiformă). Au fost identificate mai multe tipuri de transformări chimice, care conduc la produşi ai genei mutante. Pe baza transformărilor produse în ADN, sub acţiunea unui agent mutagen, mutaţiile punctiforme se pot clasifica în patru tipuri (fig. 7.15) (2):

- mutaţii tranziţionale;
- mutaţii prin transversie;
- mutaţii prin inserţie;
- mutaţii prin deleţie.

Mutaţiile tranziţionale implică înlocuirea unei perechi de baze purinică şi pirimidinică cu o altă pereche, astfel încât o bază purinică, respectiv pirimidinică dintr-o catenă să fie schimbată cu o altă bază purinică, respectiv pirimidinică din cealaltă catenă (2). Mutaţiile tranziţionale se produc spontan, dar pot fi induse şi prin intermediul bazelor analoage, de exemplu, 5–bromuracilul şi 2–aminopurina.

Scanned with OKEN Scanner

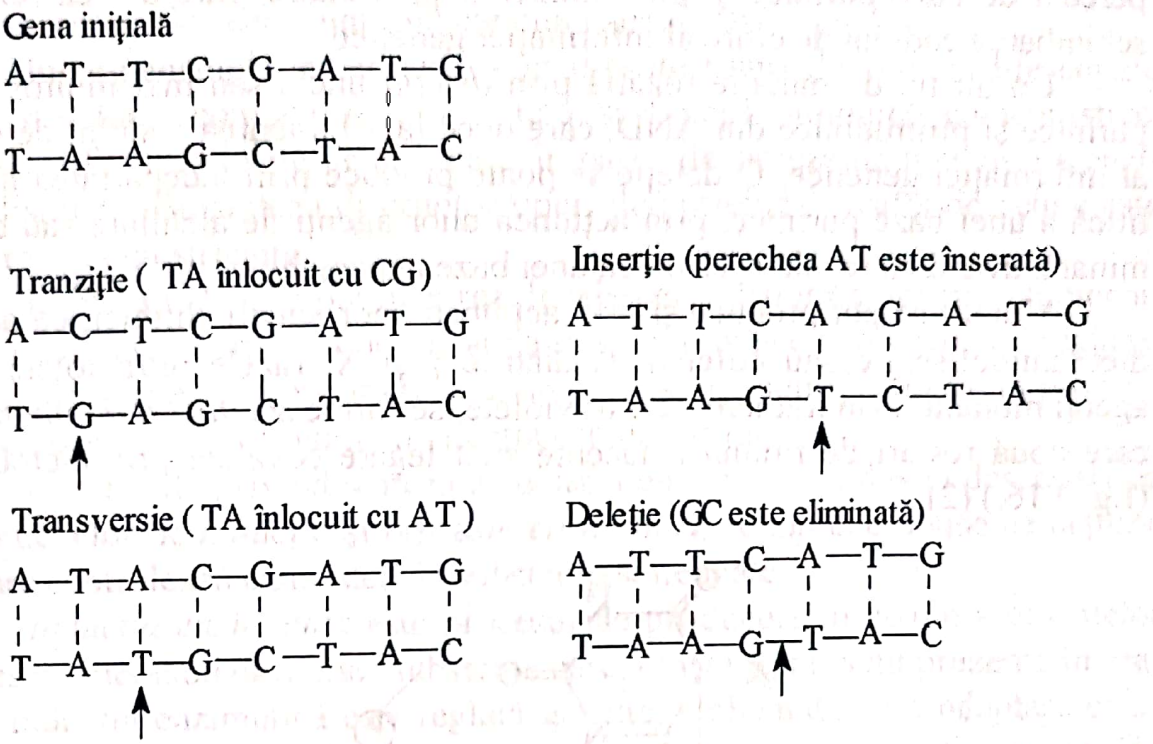
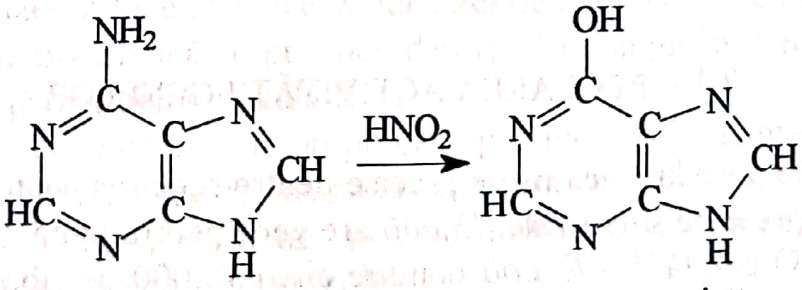


Fig. 7.15. Tipuri de mutații punctiforme (2)

Deoarece 5 – bromuracilul are o structură foarte apropiată de a timinei, el este înserat în cursul replicării ADN ca acid 5–bromuracil, în poziția ocupată normal de timină. 2–Amino-purina acționează în mod similar; ea poate fi citită fie ca adenină (A), fie ca guanină (G). Mutațiile tranziționale pot fi produse şi de acidul azotos, care, prin dezaminarea adeninei, formează hipoxantina.



În *mutațiile prin transversie*, o pereche de baze purină–pirimidină este înlocuită cu una pirimidină–purină.

Inserția, un alt tip de mutație punctiformă, implică introducerea unei perechi de baze purinice și pirimidinice suplimentare, care are ca rezultat schimbarea codului de citire al informației genetice.

Un alt tip de mutație rezultă prin *deleția* uneia sau mai multor baze purinice și pirimidinice din AND, care duce la schimbarea codului de citire al informației genetice. O deleție se poate produce prin îndepărtarea hidrolitică a unei baze purinice, prin acțiunea unor agenți de alchilare sau dezaminare, având ca rezultat formarea unei baze nepereche.

Mutații se pot produce și prin acțiunea unor agenți chimici, ca acidul dietilamidolisergic sau cofeina. Radiațiile γ și X, razele ultraviolete sunt agenți mutanți. Prin iradiere cu ultraviolete, se formează *dimeri de timină*, în care două resturi de timină adiacente sunt legate covalent prin ciclobutan (fig. 7.16.) (2).

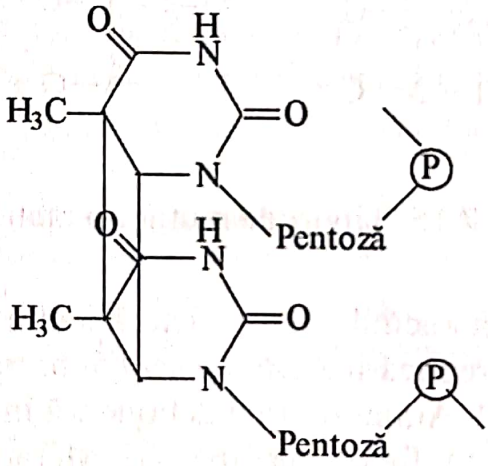


Fig. 7.16. Structura dimerului de timină

7.7.1. REGLAREA ACTIVITĂȚII GENELOR

Celulele posedă mecanisme precise pentru reglarea cantităților relative a diferitelor proteine sintetizate. *E. coli* are gene pentru circa 3.000 de proteine diferite. O celulă din *E. coli* conține circa 15.000 de ribozomi, ceea ce înseamnă că fiecare proteină din cele 50 sau mai multe proteine ribozomale este prezentă în circa 15 000 cópii (2). Dacă unele proteine sunt sintetizate în număr exact și constant, altele, cum sunt cele ale căii glicolitice, sunt prezente într-o concentrație care variază în funcție de disponibilitățile de materiale nutritive din mediu. Deci, reglarea vitezei de sinteză a enzimelor este în funcție de necesarul fiecărui tip de celule pentru desfășurarea activităților lor

Scanned with OKEN Scanner

fundamentale şi face posibilă o economisire în utilizarea aminoacizilor la sinteza enzimelor care sunt folosite după necesităţi.

În organismele superioare, sunt diferite tipuri de celule, diferenţiate prin structură, compoziţie moleculară şi funcţii biologice caracteristice. Aceste diferenţieri sunt determinate, în parte, de sinteza unor seturi de enzime distincte. Biosinteza diferitelor tipuri de proteine în astfel de celule este programată cu strictețe.

În literatură, s-au publicat rezultatele cercetărilor de genetică şi biochimie referitoare la procesul de reglare a sintezei proteice la procariote. Reglarea exprimării genelor la eucariote este un proces mai complex decât la procariote, care este, în continuare, în atenţia cercetătorilor.

Cercetările privind sinteza celulară a enzimelor au dus la descoperirea fenomenelor de *inducţie* şi *represie enzimatică,* fenomene opuse ca acţiune şi care controlează cantitatea de substanţe sintetizate.

Inducţia enzimatică este procesul de producere în celule a enzimelor necesare metabolizării unor substanţe care, obişnuit, nu sunt prezente în mediu. Inducţia enzimatică este reglată genetic, realizându-se o adaptare enzimatică a organismelor, în care este posibil să se utilizeze medii variate. Un exemplu de inducţie enzimatică sunt concluziile cercetărilor lui F. Dienert referitoare la drojdia de bere (*Saccharomices cerevisiae*), care poate fermenta lactoza din lapte cu ajutorul *lactazei.* Tulpinile de drojdie de bere crescute pe parcursul a mai multor generaţii, pe un mediu ce a conţinut lactoză, au o cantitate mare de lactază, astfel că acestea încep fermentaţia la aproximativ o oră de incubaţie. În cazul tulpinilor care nu au fost crescute în mediu de lactoză, fermentaţia nu are loc din cauza lipsei lactazei. Totuşi, în mediu cu lactoză, fermentaţia începe după circa 14 ore de incubaţie, ceea ce arată că prezenţa lactozei induce producerea lactazei de către celulele de drojdie (5).

Inducţia enzimatică se produce datorită prezenţei în mediu *a inductorului*, substanţă ce trebuie metabolizată.

Represia enzimatică este un proces opus inducţiei enzimatice, prin care este inhibată sinteza proteică datorită unui *represor*.

Pe baza celor prezentate, privind inducţia şi represia enzimatică, proteinele şi enzimele se pot grupa în:

– enzime constitutive şi proteine constitutive sintetizate în cantităţi constante, cu viteză constantă, indiferent de starea organismului, indiferent de prezenţa sau absenţa substratului, datorită activităţii unor gene constitutive;

– enzime adaptive produse numai când sunt necesare pentru metabolizarea unor constituenţi ai mediului.

Scanned with OKEN Scanner

F. Jacob şi J. Monod au presupus existenţa unor gene reglatoare care determină sinteza unor represori, proteine citoplasmatice, ce au rolul de a permite sau a împiedica alte gene de a realiza sinteza enzimatică.

Moleculele represorilor pot fi inactivate dacă sunt combinate cu moleculele mici de inductori (de exemplu, lactoză) sau pot fi activate dacă sunt combinate cu molecule de corepresori (de exemplu, histidina).

După funcţia lor, genele sunt divizate în *gene structurale, gene reglatoare* şi *gene operatoare.* Genele structurale codifică diferite proteine cu rol structural sau enzimatic. Genele operatoare declanşează sau nu activitatea genelor structurale, iar genele reglatoare controlează sau dirijează activitatea genelor operatoare sau a genelor structurale.

Genele structurale afectează fiecare o enzimă, conform principiului *o genă – o enzimă* şi sunt funcţional independente.

Genele reglatoare nu funcţionează pe principiul *o genă – o enzimă*, ele au rolul de a regla sinteza mai multor enzime.

Represorii pot controla sinteza mai multor enzime, prin intermediul unei regiuni cromozomale adiacente denumite *operator.* Genele aflate sub controlul unui singur represor alcătuiesc *un operon.*

Operonul este ansamblul format din mai multe subunităţi, *operatorul, genele structurale, promotorul* şi *gena operatoare*, care alcătuiesc împreună un segment cromozomial. El poate fi „citit" de ARNm de la un cap la altul al moleculei de ADN într-un anumit sens (F. Jacob, J. Monod).

Operatorul este un segment de ADN, plasat pe cromozom alături de genele structurale; are o genă operatoare adiacentă genelor structurale, care are posibilitatea de a se combina sau nu cu represorul, inducând sau blocând funcţionarea genelor structurale. Gena operatoare are rolul de a recepţiona semnalele emise de genele reglatoare şi de a acţiona asupra genelor structurale.

Promotorul constituie locul de iniţiere a sintezei ARNm şi este elementul care limitează nivelul maxim al transcrierii mesajului.

Genele structurale sunt tot un segment de ADN şi controlează producerea unor substanţe cu rol structural sau enzimatic.

Într-o zonă a cromozomului, se află genele reglatoare ale operonului al cărui produs este represorul, care este eliberat în citoplasmă şi se fixează pe operator în mod specific.

Genele reglatoare acţionează asupra mai multor gene structurale. Acestea realizează reglajul sintezei enzimelor, prin intermediul unui represor, care se opune transferului de informaţie genetică de la genele structurale la locul de sinteză a enzimelor (2).

Scanned with OKEN Scanner

Transcrierea mesajului începe cu promotorul aflat înaintea genelor structurale, se produc moleculele de ARNm ce conţin transcrisă informaţia genetică a mai multor gene structurale adiacente din operon.

Genele structurale din ADN nu pot produce adaptarea activităţii de biosinteză celulară la nevoile de moment. De aceea, în celulă, există genele reglatoare, plasate în altă parte pe cromozom, care determină sau inhibă activitatea genelor structurale, astfel că în celulă se produce sinteza enzimelor strict necesare activităţii metabolice la un anumit moment şi în cantitatea necesară.

Din cele prezentate mai sus, rezultă că genele sunt localizate în cromozomi, sunt particule materiale aranjate liniar de-a lungul cromozomului şi fiecare genă ocupă un loc bine definit, numit *locus*.

– Gena are următoarele caracteristici de bază: este unitate funcţională, în sensul că determină caracteristicile ereditare, este unitate mutaţională, adică structura chimică a genei se schimbă prin mutaţie, ceea ce duce la apariţia caracterului nou şi este unitate de recombinare, adică poate avea loc schimb de gene între cromatidele nesurori ale cromozomilor omologi.

– Gena stabileşte ordinea aminoacizilor în molecula proteică. Fiecare genă controlează sinteza şi funcţionarea unei anumite enzime.

– O genă este alcătuită din aproximativ 900 – 1 500 de nucleotide din lanţul ADN sau ARN viral dispuse liniar.

– Gena este definită ca un segment de ADN sau ARN viral care conţine informaţia genetică necesară sintezei unei catene polipeptidice. Gena este alcătuită dintr-o secvenţă de codoni care codifică succesiunea aminoacizilor într-o catenă polipeptidică.

– Conform concepţiei „o genă – o catenă polipeptidică", unele proteine sunt sintetizate pe baza informaţiei genetice din două sau mai multe gene.

– În cadrul genei, pot avea loc recombinări şi mutaţii.

– Sunt gene structurale şi reglatoare: genele structurale codifică sinteza proteinelor, iar genele reglatoare controlează şi dirijează acţiunea genelor structurale.

– Există mecanisme ale reglării activităţii genelor care diferă la procariote de cele de la eucariote.

La procariote, genomul bacterian este alcătuit din gene esenţiale localizate în cromozomul bacterian şi gene accesorii localizate în afara cromozomului bacterian. Genomul bacterian este reprezentat printr-un număr restrâns de gene (exemplu, *E. coli* are circa 4 000 de gene) şi conţine un singur grup de legătură. Transmiterea caracterelor ereditare, la procariote, diferă de cea de la eucariote, deoarece lipseşte procesul clasic al reproducerii sexuale.

Scanned with OKEN Scanner

La eucariote, materialul genetic are o organizare mult mai complexă. Moleculele liniare de ADN dublu catenare formează complexe cu proteinele histonice, alcătuind fibra elementară nucleohistonică (nucleozomală). Aceste substanțe, complexându-se cu ARN şi proteinele nehistonice, formează cromatina, materialul prin care se diferențiază în procesul de diviziune, cromozomii.

7.8. MĂSURAREA CONCENTRAȚIEI ŞI PURITĂȚII ACIZILOR NUCLEICI

7.8.1. METODE OPTICE

ADN şi ARN absorb razele ultraviolete foarte puternic, iar absorbția optică poate fi folosită cu exactitate, rapid şi nedestructiv la măsurarea concentrației, chiar şi atunci când aceasta este foarte mică (de exemplu, 2,5 μg / ml) (6).

O foarte utilă aproximație a acestei absorbții este şi a amestecului de ADN şi ARN în soluție apoasă.

Absorbția razelor ultraviolete, în cele mai multe cazuri, se foloseşte pentru estimarea purității relative a diferitelor preparate de acizi nucleici. Este o metodă rapidă, uşor de realizat şi nu reclamă denaturarea ADN sau ARN. Spectrul relevant este între 230 şi 320 nm. Absorbția la 320 nm este mult mai mare decât la 260 nm şi indică prezența substanțelor străine nedorite.

7.8.2. METODA FLUORESCENȚEI

Fluorescența bromurii de *ethidium* creşte de aproximativ 50 de ori când se interpune ADN. Când fluorescența este provocată de razele ultraviolete şi emisiunea este în spectrul vizibil, se pot utiliza metode foarte simple de evidențiere a ADN.

Mai mult, cuantumul ridicat produce o sensibilizare ridicată. Se poate detecta prin metoda fluorescenței, în determinări cantitative, până la 2,5 ng de ADN, dar, spre deosebire de absorbția în UV, se produce degradarea ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Cu ajutorul fluorometrului se poate determina cantitativ ADN pe seama creşterii fluorescenţei bromurii de *ethidium* în prezenţa ADN.

20 µl soluţie tampon (0,01 M Tris – HCl, pH = 7,4, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA şi 1µg / ml bromură de ethidium) se pun pe suprafaţa transiluminatorului de lungimi de unde scurte UV (260 nm) (Mineralight, Ultraviolet Pro-ducts, Inc., San Gagriel, Calif.).

Se adaugă 5 µl din soluţia standard de ADN (10 µg / ml), se amestecă bine şi se citeşte la spectrofotometru. Se face o serie de cinci diluţii, din soluţia standard de ADN, pentru a se trasa curba etalon, pe baza căreia se determină concentraţia soluţiei de analizat.

7.9. PĂSTRAREA ADN

Cu precauţii specifice, ADN pur poate fi păstrat o perioadă lungă de timp cu o mică degradare. Păstrând la 4°C în 10 mM Tris, pH = 8,0, 1 mM EDTA se produc degradări neînsemnate, doar o singură scindare la 3.10^5 perechi de baze purinice şi pirimidinice dintr-o structură de ADN.

Se utilizează pH = 8, deoarece rata dezaminării ADN este mai redusă decât la păstrarea la pH=7. Prezenţa EDTA îndepărtează cationii divalenţi liberi care favorizează activitatea celor mai multe nucleaze. EDTA inhibă, de asemenea, dezvoltarea microorganismelor care pot sintetiza mari cantităţi de nucleaze.

7.10. PURIFICAREA ADN

Preparatele de ADN sunt frecvent contaminate cu substanţe care inhibă enzimele, degradează ADN sau cauzează o proporţie artificială de migrare a ADN în geluri. În unele cazuri, pot fi utilizate metode simple pentru înlăturarea unor astfel de situaţii, cum ar fi extracţia cu fenol urmată de o precipitare cu etanol.

O problemă specifică a preparatelor de ADN din celulele eucariote este prezenţa carbohidraţilor cu greutate moleculară înaltă. Aceştia pot inhiba reacţiile enzimatice, dar pot fi eliminaţi prin centrifugare.

Purificarea ADN se face şi pe coloana cromatografică cu DEAE– celuloză sau hidroxiapatită. În aceste metode cromatografice, ADN este legat selectiv în materialul din coloană. Contaminanţii sunt spălaţi şi apoi ADN, eluat. Se pot utiliza soluţii de ADN foarte diluate, dar şi soluţii concentrate.

Scanned with OKEN Scanner

7.11. PRECIPITAREA ADN

Precipitarea ADN cu etanol este metoda standard pentru concentrarea ADN. Această metodă se poate aplica şi la precipitarea ADN în cantităţi mici de ordinul nonagramelor din soluţii păstrate în sticlărie siliconizată sau vase de plastic.

Precipitarea cu acid tricloracetic este utilizată la separarea acizilor nucleici oligomeri radioactivi de nucleotide şi nucleozide radioactive. Se procedează la precipitarea oligomerilor şi la colectarea lor pe filtru. Oligonucleotidele care conţin 10 – 20 de nucleotide sunt reţinute şi ele pe filtru.

Precipitarea şi fracţionarea după mărime a ADN cu polietilen glicol. Polietilen glicolul precipită ADN aproape cantitativ, cu condiţia ca concentraţia iniţială a ADN să fie mai mare de 50 µg / ml. Nu degradează ADN. Precipitarea cu polietilen glicol poate fi selectivă pentru diferitele mărimi de molecule de ADN, utilizând diferite concentraţii de polietilen glicol. O astfel de metodă poate fi folosită, de asemenea, la separarea ADN plasmatic de ADN cromozomal.

7.12. IZOLAREA ADN DIN *ESCHERICHIA COLI*

Izolarea ADN din *Escherichia Coli* pune relativ puţine probleme. Se obţine un ADN foarte pur, cu o valoare medie a mărimii fragmentelor mai mare de 10 kb.

Exemplul de mai jos de obţinere a ADN din *E. Coli* este o metodă modificată a cercetătorilor Sato şi Miura (1963).

Toate operaţiile cu ADN au loc la 0°C. Creşterea celulelor se face staţionar, peste noapte, în 5 ml de mediu YT {1.000 ml apă distilată, 5 g NaCl, 8 – 10 g YT (Bactotryptone), 5 g extract fermentativ}. Se centrifughează 3 x 1,5 ml de celule în centrifuga Eppendorf. Se resuspendă pastilele de celule rezultate de la centrifugare în 15 µl soluţie de lizozime (proaspăt dizolvată, la concentraţia de 2 mg / ml în 0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, la pH = 8). Se supune la incubaţie la 37°C pentru 10 – 20 min, până ce are loc liza la celule. Liza este indicată de creşterea vâscozităţii. Se imobilizează în gheaţă de etanol uscată. La celulele congelate, se adaugă 125 µl soluţie tampon formată din: 1% SDS, 0,1% M NaCL, 0,1 M Tris – HCl, pH = 9. După adăugare, se agită pentru ca celulele să se dezgheţe. Se adaugă 150 µl soluţie tampon

Scanned with OKEN Scanner

menţionată mai sus, saturată cu fenol şi apoi se agită. Urmează o centrifugare de 3 min. la centrifuga Eppendorf. Se separă faza superioară apoasă care conţine ADN şi se adaugă 300 µl etanol de 95 %. Se agită, se imobilizează în gheaţă la – 20 sau – 70°C pentru 30 min. şi se centrifughează la centrifuga Eppendorf, timp de 5 min. Se resuspendă pastilele de ADN rezultate de la centrifugare în 100 µl de soluţie tampon de 0,1 x SSC (175 g NaCl, 88 g citrat de sodiu, 1.000 ml apă distilată, care se aduce la pH = 7 cu aproximativ 1 ml HCl concentrat). Se produce dizolvarea ADN, apoi se adaugă 5 µl soluţie tampon SSC. Se adaugă 4 µl RNase TI (Sigma, R8521) cu 0,8 mg / ml şi 3µl Rnase A (Sigma, R4875) cu 2 mg / ml şi se incubă la 37°C timp de 30 min. Se adaugă 100 µl SSC saturat cu fenol, se agită şi se centrifughează 3 min. Se separă stratul apos şi se precipită ADN în etanol.

7.13. IZOLAREA PLASMID ADN

Pasmidele sunt elemente genetice extracromozomale ale celulelor din aproape toate bacteriile şi pot fi, de asemenea, găsite în fungi, protozoare şi chiar în unele plante şi animale. Plasmidele sunt molecule ADN circulare, se reproduc singure, separat de cromozomi, prin diviziune celulară succesivă; ele includ factorul F şi factorul R. Plasmidele pot deveni integrate în cromozomi şi uneori sunt denumite *episomes plasmin*, enzime proteolitice cu mare specificitate pentru fibrină şi au abilitatea deosebită de dizolvare, formând fibrină sub formă de ghem.

Plasmidele sunt un important instrument utilizat în ingineria genetică şi, de asemenea, sunt o cale de a înţelege modelul în care bacteriile cauzează bolile umane. Plasmidele au, în general, mai puţine gene decât ADN din cromozomi. Unele plasmide ajută bacteriile de a face uz de surse de hrană neuzuale, cum sunt camforul sau petrolul. Plasmidele permit bacteriilor să degradeze sau să inactiveze antibioticele utilizate la stoparea creşterii bacteriene sau să supravieţuiască în prezenţa metalelor grele, convertind aceste metale într-o formă lipsită de toxicitate. Alte plasmide permit unor bacterii de a produce chimicale care sunt toxice pentru alte organisme ca: insectele, oamenii şi unele bacterii. Unele bacterii au plasmide cunoscute ca *plasmide virulente*, care au caracter toxic şi sunt dăunătoare omului.

Un procedeu utilizat frecvent de izolare a plasmid ADN se desfăşoară în patru etape:

1. creşterea numărului de cópii de plasmide pe celulă;
2. purificarea plasmidelor din cele mai multe materiale bacteriene;

Scanned with OKEN Scanner

3. separarea plasmid ADN super-răsucite de alte ADN şi de cele mai multe sfărâmături bacteriene rămase;

4. îndepărtarea materialului de contaminare cu greutate moleculară mică prin filtrare pe gel.

Plasmidele pot fi împărţite în două clase după modul lor de replicare. Cel mai util pentru manipulările ingineriei genetice este controlul replicării relaxate a ADN. Plasmidele din această clasă, în contrast cu ADN bacterian gazdă nu cere continuarea sintezei proteice pentru această replicare. De aceea, în prima etapă a procedurii izolării plasmidelor, poate fi amplificată selectiv prin adăugarea inhibitorilor de sinteză a proteinelor în cultura bacteriană. În practică, aceştia au ca urmare creşteri de 10 – 20 de ori în beneficiul plasmidelor.

A doua etapă a acestui procedeu este liza blândă a bacteriei, în combinaţie cu detergenţi slabi. Centrifugarea, îndeajuns de energică, formează un precipitat care conţine cel mai mult ADN crozomal al gazdei bacteriene, cele mai multe membrane şi alte structuri mari. Plasmidul ADN şi alte molecule mici se găsesc în supernatant.

În a treia etapă, se adaugă *ethidium bromid* şi CsCl la supernatant şi soluţia rezultată se centrifughează într-o ultracentrifugă. *Ethidium bromid* se intercalează între bazele din helixul ADN, reducând densitatea helixului.

În etapa a patra, are loc o filtrare pe gel pentru îndepărtarea substanţelor contaminante cu greutate moleculară mică.

* * *

Dintre metodele de analiză a acizilor nucleici, se menţionează analiza cu raze X, determinarea constantei de sedimentare prin ultracentrifugare, metoda cu izotopi radioactivi, metode cromatografice folosite la izolarea, purificarea şi caracterizarea diferitelor tipuri de acizi nucleici (cromatografia de adsorbţie pe amidon, cărbune, kiselgur, geluri de fosfat de calciu, albumină metilată, cromatografia pe răşini schimbătoare de ioni, cromatografia pe hârtie şi cromatografia în strat subţire).

Purinele şi pirimidinele, ca şi nucleozidele şi nucleotidele se pot analiza calitativ şi cantitativ aproape exclusiv pe cale cromatografică. Pentru separarea bazelor purinice şi pirimidinice, se folosesc: cromatografia pe coloană cu schimbători de ioni, cromatografia pe hârtie şi cromatografia în strat subţire. Aceste metode se aplică la diferite amestecuri de virusuri, bacterii, levuri, ţesuturi vegetale şi animale.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă:

1. Nenițescu, C. D., *Chimie organică*, Vol. II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
2. Leninger, A.L., *Biochimie*, Vol. I şi II, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, 1992.
3. Ceapoiu, N., *Genetica şi evoluția populațiilor biologice*, Editura Academiei Române, Bucureşti, 1976.
4. Diculescu, I., Onicescu, D., Benga, G., Popescu, L.M., *Biologie celulară*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1983.
5. Raicu, P., Ionescu-Varo, M., Gancevici, G., Moisescu, G., *Celula, structură, ultra-structură şi funcții*, Editura Academiei Române, Bucureşti, 1987.
6. Schleif, R.F., *Practical Methods in Molecular Biology*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1981.
7. Berman, H.M., Olson, W.K., Beveridge, D.L.,Westbrook, J., Gelbin, A. Demeny, T., Hsich, S.H., Srinivasan, A.R., Schneider, B., *Biophys. J.*, 63, pp. 751–759, 1992.
8. Berman, H.M., Westbrook, J., Feny, Z., Iype, L., Schneider, B., Zordecki, C., *Structural Bioinformatics*, pp. 199–216, 2003.
9. Cannoere, J.J., Subramanian, S., Schnare, M.N., Collett, J.R., D'Souza, L.M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabursy, L.V., Muller, K.M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N., Guttel, R.R., *BMC Bioinformatics 3*, p. 2, 2002.
10. Batenburg, F.H.D., van Galtynaev, A.P., Pleiy, C.W.A., *Nucleic Acid Res.*, 29, pp. 194–195, 2001.
11. Griffiths-Jones, S., Batelnan, A., Marshall, M., Khanna, A., Eddy S.R., *Nature Rev. Genet.*, 31, pp. 439–441, 2001.
12. Gan, H.H., Pasquali, S., Schlick, T., *Nucleic Acid Res.*, 31, pp. 2926–2943, 2003.
13. Eddy, S.R., *Nature Rev. Genet.*, 2, pp. 919–929, 2001.
14. Rivas, E., Klein, R.J., Jones, T.A., Eddy, S.R., *Curr. Biol.*, 11, pp. 1369–1373, 2001.
15. Storz, G., *Science*, 296, pp. 1260–1263, 2002.
16. Watson, J.D., Crick, H.C., *A Structure for Deoxyribose, Nucleic Acid*, Nature, 2 April, 1953, vol. 171, 737, 1953, Commentary by Tom Zinner.
17. Tănase, I, *Tehnica cromatografică*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1967.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 8

AMINOACIZII

8.1. Considerații generale 273
8.2. Proprietățile fizice ale aminoacizilor 284
8.3. Proprietățile chimice ale aminoacizilor 295
8.4. Stereochimia aminoacizilor 300
8.4.1. Configurația aminoacizilor 302
8.5. Biochimia aminoacizilor 309
8.5.1. Aminoacizii în alimentație 309
8.5.2. Degradarea oxidativă a aminoacizilor 311
8.5.3. Decarboxilarea aminoacizilor de către microorganisme 319
8.5.4. Transaminarea 322
8.6. Aminoacizi mai importanți și derivații lor 324
8.7. Sinteze de aminoacizi 329

Bibliografie *336*

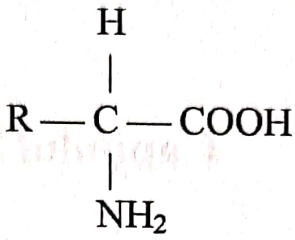
8.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Aminoacizii sunt unitățile constituente ale proteinelor, ei determinând multe dintre proprietățile importante ale acestora.

Primul aminoacid separat dintr-un hidrolizat proteic a fost glicocolul sau glicina de către H. Braconnot (1). În proteine, se găsesc frecvent 20 de aminoacizi. Pe lângă aceştia, sunt cunoscuți şi alți aminoacizi care îndeplinesc unele funcții în celule, precum şi în unele microorganisme şi plante.

Formula generală structurală a celor 20 de α–aminoacizii frecvent întâlniți în proteine, cu excepția prolinei, prezintă o grupare amino liberă şi o

grupare carboxil liberă, ambele legate la un atom de carbon α, precum şi o catenă laterală R, deosebindu-se între ei prin structura catenelor laterale, numite *radicali R*:



După proprietăţile lor, aminoacizii se pot grupa în două clase: *alifatici* şi *aromatici*. Din prima clasă, fac parte aminoacizii care au grupele COOH şi NH_2 legate la o catenă alifatică, chiar dacă molecula lor cuprinde şi inele aromatice sau heterociclice. În moleculele aminoacizilor aromatici, cele două grupe funcţionale sunt legate de un inel arilic. Aminoacizii alifatici se împart α–, β–, γ–aminoacizi etc., după poziţia ocupată în catenă de grupa aminică faţă de grupa carboxilică.

După structura lor chimică se disting şase grupe de α–aminoacizi prezenţi în proteine:

1. *Aminoacizi monoamino-monocarboxilici: glicocolul sau glicina, alanina, valina, leucina, izoleucina* şi *fenilalanina;*
2. *Aminoacizi dicarboxilici: acidul asparagic (acidul aspartic), acidul glutamic*;
3. *Hidroxi–aminoacizi: serina, treonina, tirozina;*
4. *Tio–aminoacizi*: *cisteina, cistina, metionina;*
5. *Di–aminoacizi: ornitina, lizina, arginina, hidroxilizina;*
6. *Aminiacizi heterociclici: Prolina, hidroxiprolina, histidina, triptofanul*

Se menţionează că cisteina se obţine la hidroliza proteinelor, de obicei, sub formă de cistină, iar ornitina este conţinută în proteine sub formă de arginină. În afară de aminoacizii prezentaţi mai sus, se găsesc în natură un număr destul de mare de aminoacizi mai rari în unele proteine, peptide, în plante, în unele microorganisme etc.

O clasificare importantă a aminoacizilor este cea bazată pe polaritatea resturilor lor laterale R. După această clasificare, aminoacizii se grupează în patru clase principale:

1. *Aminoacizi cu radicali nepolari sau hidrofobi;*
2. *Aminoacizi cu radicali încărcaţi pozitiv;*

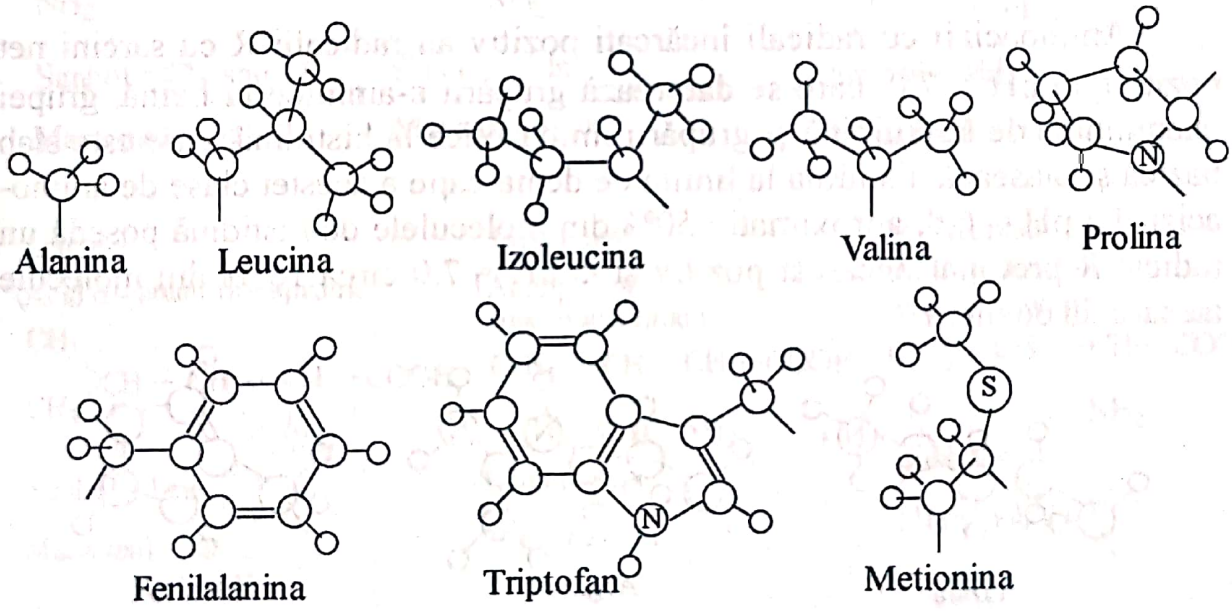
Scanned with OKEN Scanner

3. *Aminoacizi cu radicali încărcaţi negativ* (între pH 6,0 şi 7,0, intervalul de pH intracelular);

4. *Aminoacizi cu radicali polari neutri* (grupări neîncărcate).

În cadrul aceleiaşi clase de aminoacizi, sunt variaţii considerabile în mărimea, forma şi proprietăţile radicalilor R. Acest mod de clasificare a aminoacizilor poate fi pus în legătură cu cuvintele codului genetic pentru diferiţii aminoacizi prezenţi în proteine.

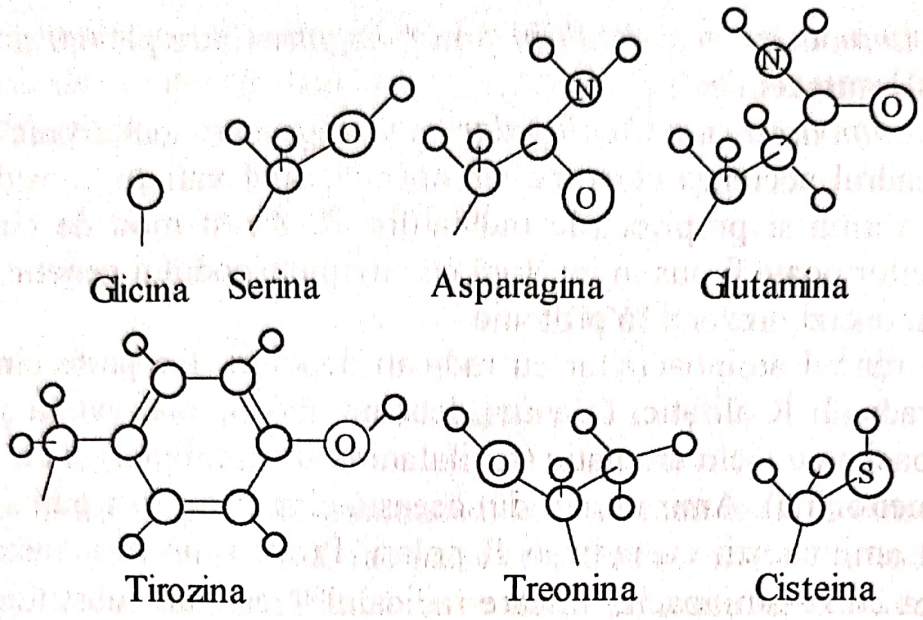
Din rândul aminoacizilor cu radicali nepolari, fac parte cinci aminoacizi cu radicali R alifatici (alanina, leucina, izoleucina, valina şi prolina), doi aminoacizi cu ciclu aromatic (fenilalanina şi triptofanul) şi un aminoacid cu sulf (metionina). Aminoacizii din această clasă sunt mai puţin solubili în apă decât aminoacizii cu radicali R polari. Prolina, un iminoacid, poate fi socotită ca un α–aminoacid, în care radicalul R este un substituient în gruparea amino.



Aminoacizi cu radicali nepolari (hidrofobi)

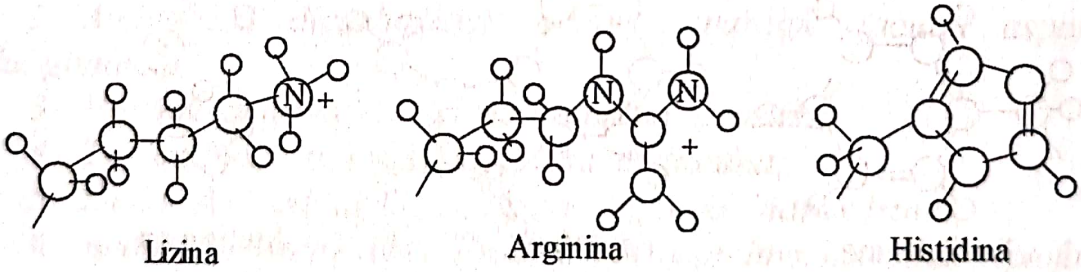
Aminoacizii cu radicali polari neîncărcaţi au la radicalii R grupări funcţionale polare neutre care pot forma legături de hidrogen cu apa; ei sunt mai solubili în apă decât aminoaczii cu radicali R nepolari. Polaritatea serinei, tirozinei şi treoninei se datorează grupărilor lor hidroxilice, polaritatea asparaginei şi glutaminei, grupărilor amidice şi cea a cisteinei, grupării sulfhidrilice. Glicina este la limita de demarcaţie a acestei grupe, deoarece radicalul său R este un atom de hidrogen, care nu poate influenţa polaritatea grupelor α–aminice şi α–carboxilice.

Scanned with OKEN Scanner

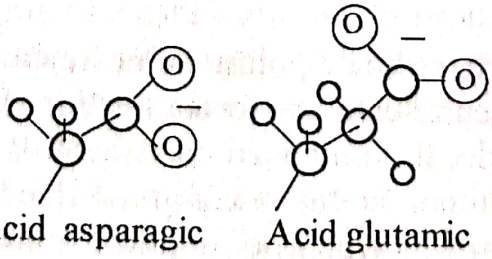


Aminoacizi cu radicali polari neîncărcați

Aminoacizii cu radicali încărcați pozitiv au radicalii R cu sarcini net pozitive la pH = 7,0, care se datorează grupării ε-aminice la lizină, grupei guanidinice de la arginină şi grupării imidazolice la histidină, care este slab bazică şi plasează histidina la limita de demarcație a acestei clase de aminoacizi. La pH = 6,0, aproximativ 50% din moleculele de histidină posedă un radical R protonat, încărcat pozitiv şi la pH = 7,0 circa 10 % din molecule au sarcină pozitivă.



Aminoacizi cu radicali încărcați pozitiv (bazici)



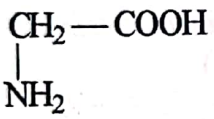
Acizi cu radicali încărcati negativ (acizi)

Aminoacizii cu radicali R încărcaţi negativ (acidul asparagic şi acidul glutamic) au câte o grupă carboxilică la radicalul R complet ionizată şi deci încărcată negativ între pH = 6 şi pH = 7.

În figura 8.1., se dau formulele chimice, simbolurile şi masele moleculare ale unor aminoacizi din proteine.

Figura 8.1.
Formulele chimice, simbolurile şi masele moleculare ale aminoacizilor

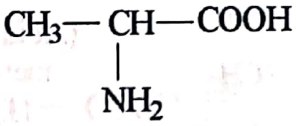
Glicina
(Acid aminoacetic)



Simbol = Gly sau Gli

Masa mol. = 75

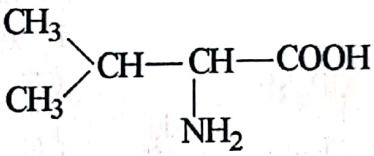
Alanina
(Acid α – aminopropionic)



Simbol = Ala

Masa mol. = 89

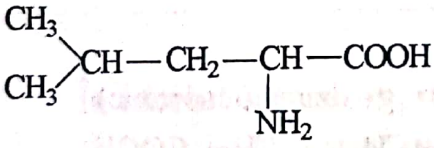
Valina
(Acid α – aminoizovalerianic)



Simbol = Val

Masa mol. = 117

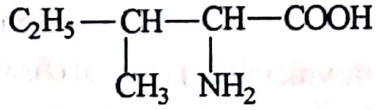
Leucina
(Acid α – aminoizocapronic)



Simbol = Leu

Masa mol. = 131

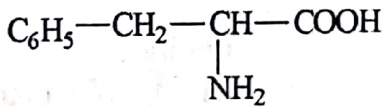
Izoleucina
(Acid β – metil – α – aminovalerianic)



Simbol = Ile

Masa mol. = 131

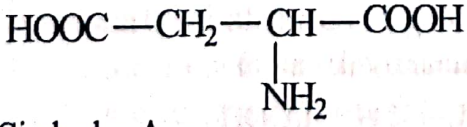
Fenilalanina
(Acid β – fenil – α – aminopropionic)



Simbol = Phe

Masa mol. = 165

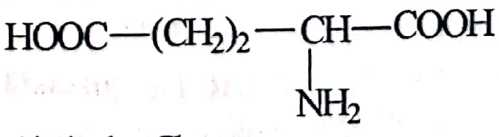
Acid asparagic (aspartic)
(Acid aminosuccinic)



Simbol = Asp

Masa mol. = 133

Acid glutamic
(Acid α – aminoglutaric)

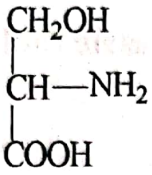


Simbol = Glu

Masa mol. = 147

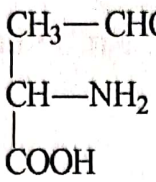
Scanned with OKEN Scanner

Serina
(Hidroxialanina)



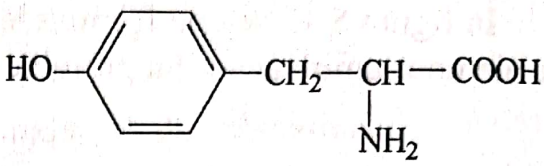
Simbol = Ser
Masa mol.=105

Treonina
(Acid β—hidroxi–α–aminobutiric)



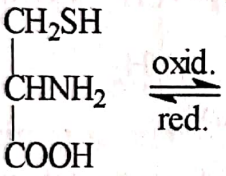
Sinbol =Thr
Masa mol.=119

Tirozina
(p—hidroxi—fenilalanina)



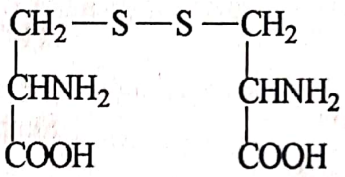
Simbol = Tyr
Masa mol.=181

Cisteina



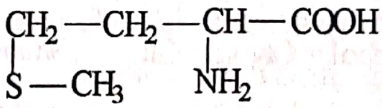
Simbol = Cys
Masa mol.=121

Cistina
(Acid di–α– amino–β–propionic)



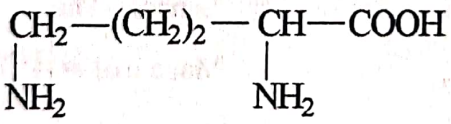
Simbol = Cys – Cys
Masa mol.=240

Metionina
(Acid α – amino–γ – metiltiobutiric)



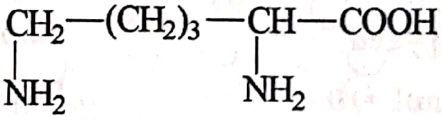
Simbol = Met
Masa mol.=149

Ornitina
(Acid α, δ – diaminovalerianic)



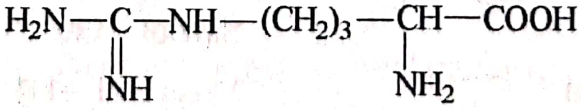
Simbol = Orn
Masa mol.=132

Lizina
(Acid α, g – diaminocapronic)



Simbol = Lys
Masa mol.=146

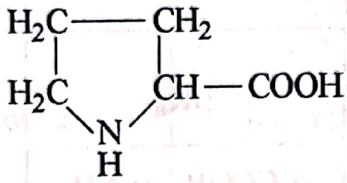
Arginina
(Acid δ – guanidil – α – aminovalerianic)



Simbol = Arg
Masa mol.=174

Prolina

(Acid pirolidin – α – carboxilic)

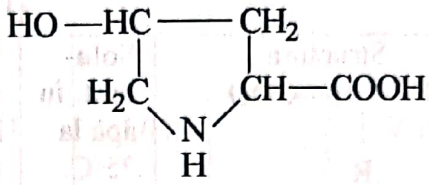


Simbol = Pro

Masa mol.=115

Hidroxiprolina

(Acid – β – hidroxi – piro – lidin – α – carboxilic)

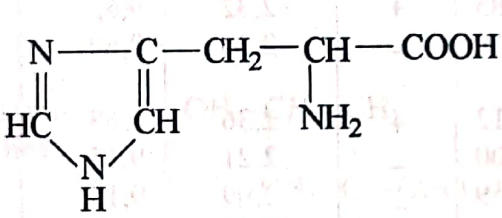


Simbol = Hipro

Masa mol.=131

Histidina

(imidazolilalanina)

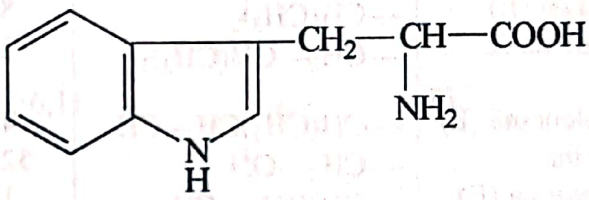


Simbol = His

Masa mol.=155

Triptofan

(indolilalanina)



Sinbol = Trp

Masa mol.=204

În tabelul 8.1., sunt prezentate o serie de caracteristici ale L–aminoacizilor, şi anume: aminoacizii esenţiali, notaţi cu E, structura radicalului R a fiecărui aminoacid, simbolul conform normelor IUPAC, rotaţia optică, punctul de topire, pK pentru α–COOH şi α–NH_2 şi pH_I.

Se menţionează că ornitina este conţinută în proteine sub formă de arginină care, la hidroliză, pierde grupa guanidinică. Cisteina se obţine, la hidroliza proteinelor, de obicei, sub formă de cistină.

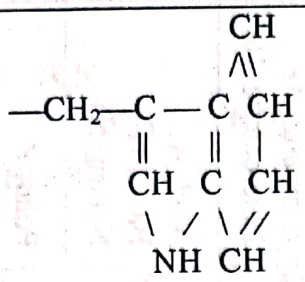
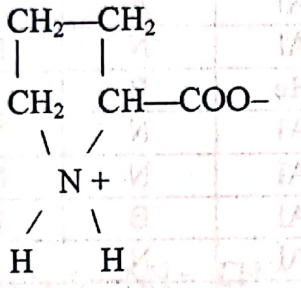
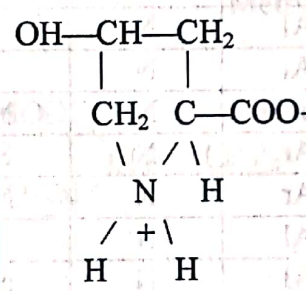
Natura chimică a resturilor laterale ale aminoacizilor pot fi grupate astfel: hidrocarbură alifatică la glicină, alanină, valină, leucină şi izoleucină; alcoolică la serină şi treonină; tiolică la cisteină; punte disulfidică la cistină; tioeterică la metionină; hidrocarbură aromatică la fenilalanină; fenolică la tirozină; heterociclu aromatic la triptofan; heterociclu nearomatic la histidină, prolină şi hidroxiprolină; acizi organici la acidul asparagic şi acidul glutamic; bază organică la arginină, lizină şi histidină.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 8.1.

Unele caracteristici ale L–aminoacizilor

Denumirea	Structura $H_3N^+—CH(R)—COO^-$ R = se dă mai jos pentru fiecare aminoacid	Solubilit. în apă la 25°C în % subst. uscată	Sensul rotației optice	pK_a		pH_I
				α-COOH	α-NH_2	
1	2	3	4	5	6	7
Glicină	—H	24,99	–	2,34	9,60	8
Alanină	$—CH_3$	16,51	+	2,35	9,66	6,02
Valină (E)	$—CH(CH_3)_2$	8,85	+	2,32	9,62	5,97
Leucină (E)	$—CH_2—CH(CH_3)_2$	2,19	–	2,36	9,60	5,98
Izoleucină (E)	$—CH(CH_3)CH—CH_3$	4,12	+	2,36	9,68	6,02
Serină	$—CH_2—OH$	52,00	–	2,21	9,15	5,68
Treonină (E)	$—CH(OH)—CH_3$	1,59	–	2,09	9,10	5,60
Cisteină	$—CH_2—SH$	-	–	1,71	9,90	5,02
Cistină	$—CH_2–S–S–CH_2—$	0,011	–	1,65	7,86	5,06
Metionină (E)	$—(CH_2)—S—CH_3$	3,38	–	2,26	9,85	5,06
Acid aspartic	$—CH_2—COOH$	0,50	–	2,28	9,21	2,98
Acid glutamic	$—(CH_2)_2—COOH$	0,84	+	2,09	9,82	3,22
Asparagină	$—CH_2—CO—NH_2$	-	–	2,19	9,67	5,41
Glutamină	$—(CH_2)_2—CO—NH_2$	-	+	2,02	8,80	5,70
Ornitină	$—(CH_2)_3—NH_2$	-	+	2,17	9,13	9,70
Lizină	$—(CH_2)_4—NH_2$	f. bună	+	1,94	8,65	9,74
Histidină E	$—CH_2—C(=CH—NH—)—N=$	4,29	–	2,18	8,95	7,59
Arginină (E)	$—(CH_2)_3—NH—C(=NH)—NH_2$	f. bună	+	2,17	9,04	10,8
Fenilalanină (E)	$—CH_2—C_6H_5$	2,96	–	1,83	9,13	5,48
			–			

Triptofan (E)		1,13		2,38	9,39	5,88
Tirozină	—CH_2—C_6H_4—OH	0,045	–	2,20	9,11	5,67
Prolină		f. bună	–	1,99	10,60	6,30
Hidroxi-prolină		36,11	–	1,92	9,73	6,33

În tabelul 8.2., se dau câteva caracteristici ale resturilor laterale ale unor aminoacizi din compoziția proteinelor.

Tabelul 8.2.

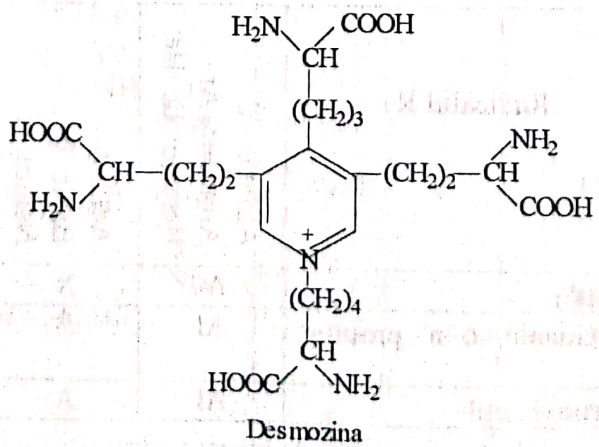
Caracteristicile de bază a radicalilor R aminoacizilor care se găsesc în compoziția proteinelor

Aminoacidul	Radicalul R	Alifatic, Al Aromatic, Ar Heterociclic, He	Acid, A Bazic, B Neutru, N	Polar, P Slab polar, SP Nepolar, NP	Ionic, I Slab ionic, SI Neionic, NI
Alanină	Metil–	Al	N	NP	NI
Arginină	ω–Guanidino–n– propil–	Al	B	P	I
Acid asparagic	Carboximetil–	Al	A	P	I

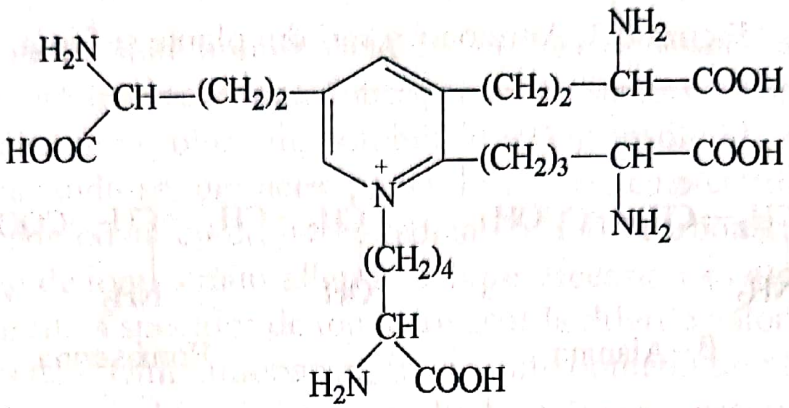
Aminoacidul	Radicalul R	Alifatic, Al Aromatic, Ar Heterociclic, He	Acid, A Bazic, B Neutru, N	Polar, P Slab polar, SP Nepolar, NP	Ionic, I Slab ionic, SI Neionic, NI
Valină	Izopropil–	Al	N	NP	NI
Acid glutamic	Carboxietil–	Al	A	P	I
Glicină	H–	Al	N	NP	NI
Histidină	Imidazolilmetil–	He	B	P	I
Izoleucină	α–Metil–n–propil–	Al	N	NP	NI
Leucină	Izobutil–	Al	N	NP	NI
Lizină	ω–Amino–n–butil–	Al	B	P	I
Metionină	Metiltioetil–	Al	N	P	NI
Hidroxiprolină	–	He	N	P	NI
Prolină	–	He	N	NP	NI
Serină	Hidroximetil–	Al	N	P	NI
Treonină	α–Hidroxietil–	Al	N	P	NI
Triptofan	Scatil–	He Ar	N	NP	NI
Tirozină	n–Hidroxibenzil–	Ar	N	SP	SI
Fenilalanină	Benzil–	Ar	N	NP	NI
Cisteină	Metiltio–	Al	N	P	SI
Cistină	Dimetildisulfid–	Al	N	NP	NI

Prin neutralizarea reciprocă a grupelor carboxilice şi aminice, rezultă o structură amfionică, care determină existenţa unui punct izoelectric (pH_i) specific pentru fiecare aminoacid şi proprietăţi de substanţă tampon. În general, aminoacizii se topesc cu descompunere peste 200°C.

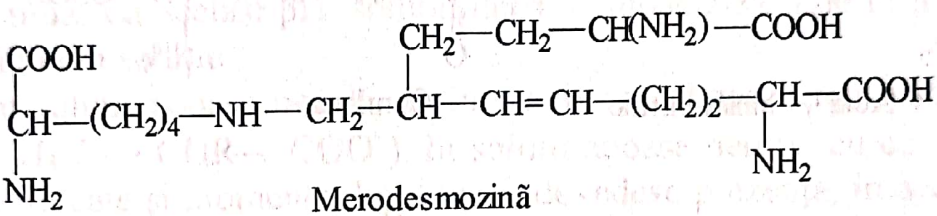
Figura 8.2 Aminoacizi rari întâlniţi în proteinele fibroase



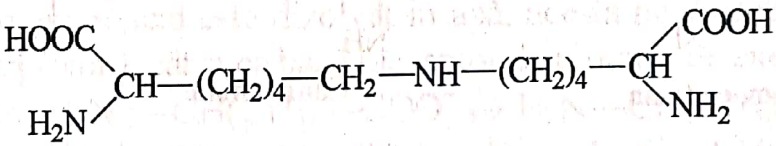
Desmozina



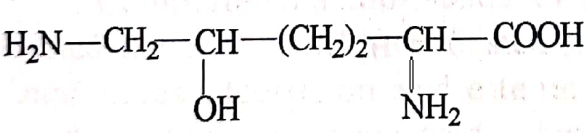
Izodezmozinã



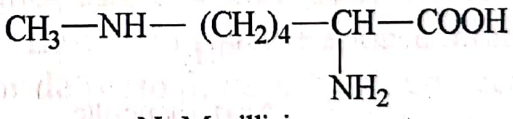
Merodesmozinã



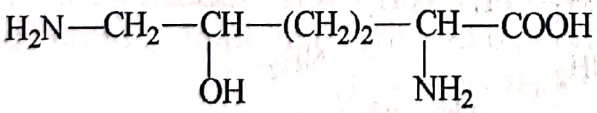
Lizinonorleucinã



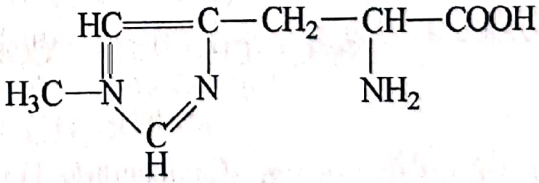
4–Hidroxiprolina



ε – N–Metillizina



5–Hidroxilizina



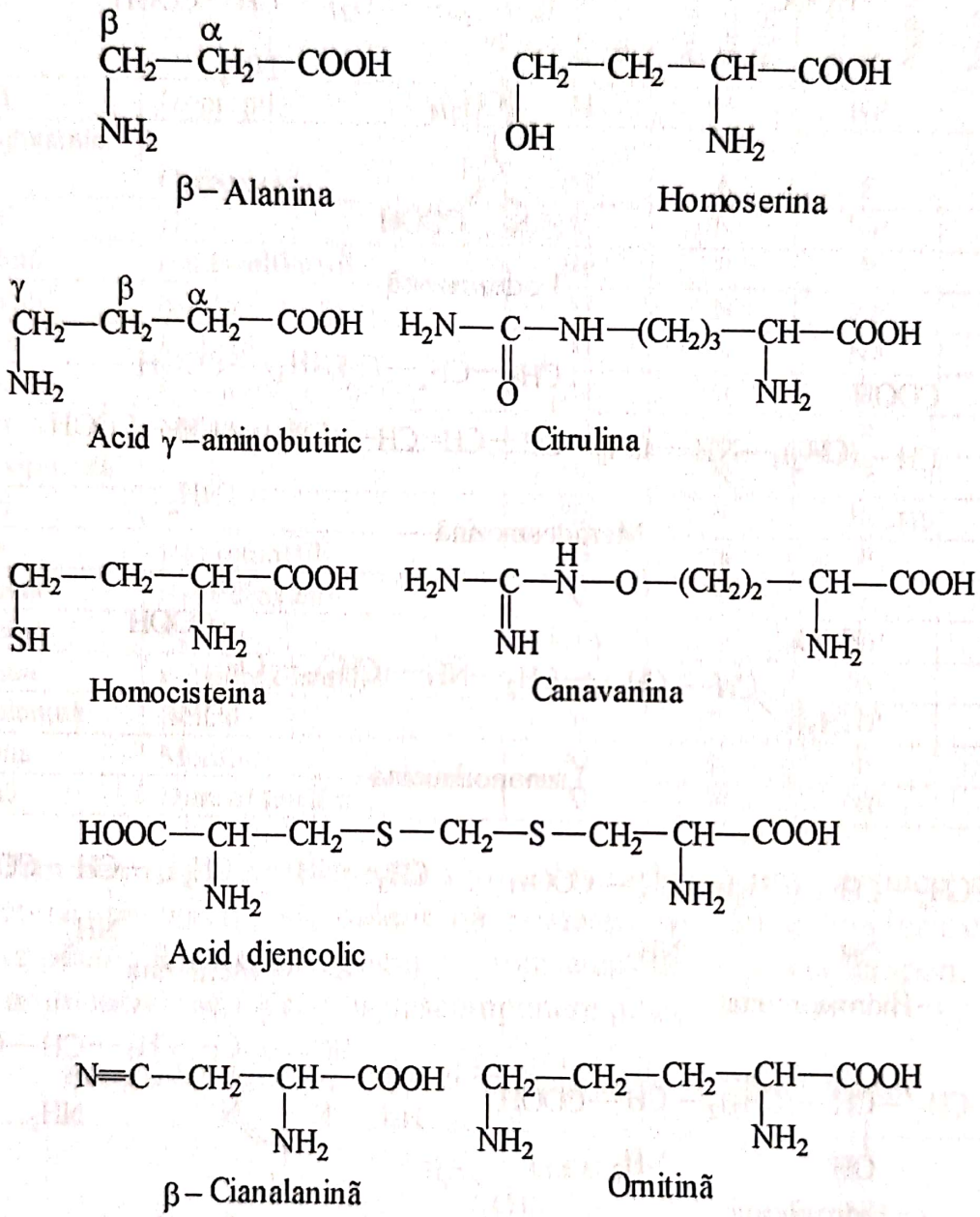
3–Metilhistidina

Aminoacizii sunt solubili în apă şi insolubili în solvenţi nepolari. Unii aminoacizi, în anumite domenii de pH, sunt foarte greu solubili. Solubilitatea aminoacizilor este influenţată de prezenţa ionilor străini.

În figurile 8.2. şi 8.3., sunt prezentaţi aminoacizi rari care se găsesc în proteinele fibroase, în plante şi în fungi.

Scanned with OKEN Scanner

Figura 8.3. Aminoacizi rari din plante şi fungi



8.2. PROPRIETĂŢILE FIZICE ALE AMINOACIZILOR

Aminoacizii sunt substanţe solide, albe, cristalizate, care se topesc la temperaturi de peste 200°C, cu descompunere, nu pot fi distilaţi nici măcar la vid.

Scanned with OKEN Scanner

Rețeaua moleculară a aminoacidului în stare cristalină este stabilizată prin forțe electrostatice de atracție între grupări cu sarcini opuse.

Aminoacizii sunt, obișnuit, solubili în apă și insolubili, în dizolvanții nepolari, asemănându-se, din acest punct de vedere, cu electroliții. Solubilitatea în apă scade odată cu creșterea radicalilor hidrocarbonați și variază în funcție de pH și de ionii străini aflați în soluție. Această variație se datorează solubilității diferite a speciilor de ioni care apar la diferite valori de pH și are importanță practică. Unii aminoacizi, în anumite domenii de pH, sunt foarte greu solubili și se pot obține cristalizați din hidrolizatele proteice. De exemplu, în cazul acidului glumamic, clorhidratul său, adică cationul, are solubilitate minimă. La același pH, solubilitatea aminoacizilor este influențată de ionii străini din soluție.

Din soluții apoase neutre, aminoacizii cristalizează mai ușor ca ioni dipolari (H_3N^+— CHR— COO^-). În soluții apoase neutre, cu constante dielectrice ridicate și momente dipol mari, dovedesc prezența, în aceeași moleculă, a sarcinilor pozitive și negative.

Când un aminoacid este dizolvat în apă, acesta poate acționa atât ca un acid (donor de proton), cât și ca bază (acceptor de proton), de exemplu, alanina:

– ca acid: $H_3N^+—CH(CH_3)—COO^- \leftrightarrow H_2N—CH(CH_3)COO^- + H^+$

– ca bază: $H_3N^+—CH(CH_3)—COO^- + H^+ \leftrightarrow H_3N^+—CH(CH_3)—COOH$

Substanțele cu astfel de proprietăți sunt amfotere și sunt numite *amfoliți*.

Comportarea acido-bazică a amfoliților este explicată de teoria acido-bazică elaborată de M.N. Brönsted și T.M. Lowry, în sisteme apoase diluate. După această teorie, un acid este un donor de protoni, iar o bază, un acceptor de protoni. O reacție acid – bază necesită o pereche acid – bază conjugată, formată dintr-un donor de protoni și un acceptor de protoni. De exemplu, acidul acetic este donor de protoni, iar ionul acetat este acceptor de protoni, împreună formând o pereche acid–bază conjugată:

$$CH_3—COOH \leftrightarrow H^+ + CH_3—COO^-$$

Ecuația pentru disocierea unui acid (HA) în soluție apoasă diluată implică transferul unui proton de la acid la apă, care acționează ea însăși ca acceptor de protoni pentru a da acidul H_3O^+:

$$HA + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + A^-$$

Fiecare bază conjugată are o afinitate caracteristică pentru protoni, exprimată în afinitatea OH^- pentru proton.

Scanned with OKEN Scanner

Acizii care au o slabă tendinţă de a elibera protoni în apă sunt acizi slabi, iar cei care eliberează protoni cu uşurinţă sunt acizi tari. Tendinţa oricărui acid de a disocia este exprimată prin constanta de disociere la o anumită temperatură:

$$K = \frac{(H^+)(A^-)}{(HA)}$$

În biochimie, se folosesc constantele de disociere obţinute din măsurători analitice ale concentraţiei reactanţilor şi produşilor în anumite condiţii experimentale. O astfel de constantă de disociere aparentă este notată cu K', iar pK' reprezintă exprimarea logaritmică a lui K' (pK' = lg 1/K').

În tabelul 8.3., se dau valorile lui pK' pentru unii aminoacizi.

Din datele tabelului 8.3., rezultă următoarele însuşiri ale fizico-chimiei aminoacizilor:

– Grupările carboxilice de la acizii monoaminomonocarboxilici se comportă ca acizi mai puternici decât grupările carboxilice ale acizilor alifatici (acidul acetic are pK'=4,76);

– Toţi aminoacizii monoaminomonocarboxilici cu radicali R neîncărcaţi au valorile pK_1' şi pK_2' aproape identice (glicina, alanina, leucina). Aminoacizii monoaminomonocarboxilici, în afară de histidină, au o insuficientă capacitate de tamponare la pH-ul fiziologic (pH = 6 – 8). Ei au capacitate de tamponare bună la pH-uri apropiate de pK_1' (1,3 – 3,3) şi de pK_2' (8,6 – 10,6);

– Gruparea β–carboxil de la acidul aspartic şi gruparea γ–carboxil de la acidul glutamic sunt complet ionizate la pH = 7 şi au valori mai mari ale pK' decât valorile pK' ale grupărilor α–carboxilice şi aproape egale cu ale acizilor car-boxilici alifatici (acidul acetic);

– Gruparea sulfhidril a cisteinei şi gruparea p-hidroxil a tirozinei sunt foarte slab acide şi la pH = 7, ionizează foarte puţin (8% gruparea — SH şi 0,01% gruparea — OH a tirozinei);

– Gruparea ε–aminică a lizinei şi gruparea guanidinică a argininei sunt puternic bazice. Aceşti aminoacizi la valoarea pH-ului egală cu 7 au sarcini net pozitive.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 8.3.

Valorile pK' pentru grupările ionizate ale unor aminoacizi la 25° C (1)

Aminoacidul	pK' α–COOH	PK_2' α–NH_3^+	PK_R' radical R
Glicocol	2,34	9,6	-
Alanină	2,34	9,69	-
Leucină	2,36	9,60	-
Serină	2,21	9,15	-
Treonină	2,63	10,43	-
Glutamină	2,17	9,13	-
Acid aspartic	2,09	9,82	3,86
Acid glutamic	2,19	9,67	4,25
Histidină	1,82	9,17	6,00
Cisteină	1,71	8,33	10,78
Tirozină	2,20	9,11	10,07
Lizină	2,18	8,95	10,53
Arginină	2,17	9,04	12,48

Curbele de titrare ale aminoacizilor cu radicali R ionizabili sunt mai complexe, acestea fiind o combinaţie între curba care corespunde ionizării radicalului R şi curbele corespunzătoare grupărilor α–aminice şi α–carboxilice (fig. 8.4.).

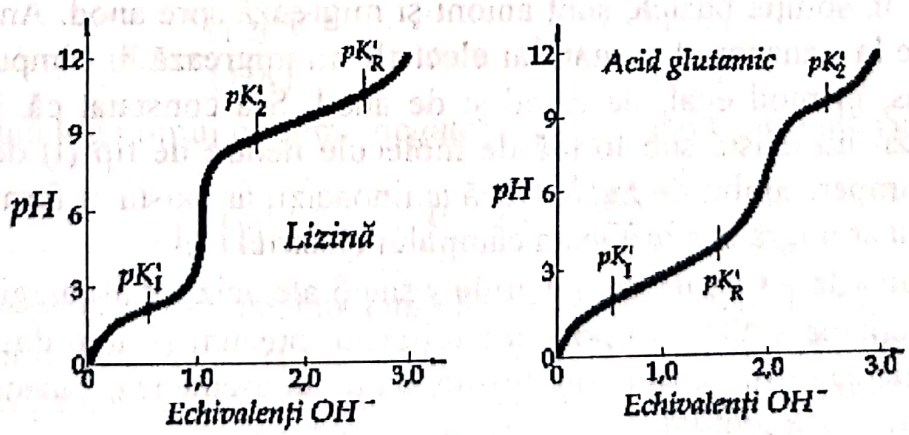


Fig. 8.4. Curbele de titrare ale acidului glutamic şi a lizinei.
pK' – ul radicalului R este notat cu pK_R' (1)

Formula (I) a aminoacizilor care conţine o grupare – NH_2 şi o grupare –COOH nu reprezintă corect structura acestor compuşi, pentru că cele două

grupe se neutralizează reciproc. Aminoacizii au structura unor amfioni sau ioni bipolari (II):

$$H_2N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COOH \quad (I) \qquad\qquad H_3N^+-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COO^- \quad (II)$$

Datorită caracterului lor amfoter, aminoacizii formează săruri atât cu acizii, cât şi cu bazele:

$$H_3N^+-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COO^- + H^+ \leftrightarrow {}^+H_3N-CH-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{COOH}} \quad (1)$$

$$H_3N^+-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COO^- + OH^- \leftrightarrow H_2N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COO^- \quad (2)$$

Aminoacizii, în mediu acid, se comportă ca baze, iar în mediu bazic, ca acizi.

Dacă în soluţia unui aminoacid, se adaugă un acid, ionii de hidrogen dispar conform reacţiei (1); dacă se adaugă un hidroxid alcalin, ionii hidroxil se neutralizează conform reacţiei (2). În ambele cazuri, pH-ul soluţiei nu se schimbă în mod apreciabil. Pe această proprietate, se bazează utilizarea aminoacizilor în soluţiile tampon.

În soluţie acidă, aminoacizii sunt cationi şi migrează la electroliză spre catod, iar în soluţie bazică, sunt anioni şi migrează spre anod. Amfionul nu contribuie la transportul curentului electric, nu migrează în câmpul electric, fiind atras, în mod egal, de catod şi de anod. S-a constatat că, în soluţie, aminoacizii nu există sub formă de molecule neutre de tip (I) decât într-o cantitate imperceptibil de mică. Dacă aminoacizii ar exista în formula (I), în soluţie, nu ar migra sub influenţa câmpului electric.

Grupările – COOH din poziţiile γ sau δ ale acizilor asparagic şi glutamic şi gruparea – NH_2 din poziţia ε a lizinei, precum şi unul din atomii de azot ai nucleului imidazolic din histidină au, de asemenea, capacitatea de a accepta sau dona protoni.

Un α–aminoacid monoamino-monocarboxilic, cum este alanina, este considerat a fi un acid dibazic în formă complet protonată, care poate dona protoni în timpul titrării sale complete cu o bază (1). Desfăşurarea unei asemenea titrări cu NaOH, care decurge în două trepte, poate fi reprezentată prin ecuaţiile următoare:

Scanned with OKEN Scanner

$$H_3N^+—CH(CH_3)—COOH + OH^- \rightarrow H_3N^+—CH(CH_3)—COO^- + H_2O$$
$$H_3N^+—CH(CH_3)—COOH + OH^- \rightarrow H_2N—CH(CH_3)—COO^- + H_2O$$

La pH = 2,34, punctul de echivalență a primei trepte, donorul de protoni (H_3N^+ — $CH(CH_3)$ — COOH) şi acceptorul de protoni (H_3N^+ — ($CH(CH_3)$ — COO^-) se găsesc la concentrații echimoleculare. La pH = 9,69, cele două specii (H_3N^+ — $CH(CH_3)$ — COO^-) şi (H_2N — $CH(CH_3)$ — COO^-) se găsesc la concentrații echimoleculare.

Se pot calcula speciile ionice ale aminoacidului la orice valoare de pH, dacă se cunosc valorile pentru pK_1' şi pK_2', cu ajutorul ecuației Henderson–Hasselbalch. Valoarea pK' a unui aminoacid se poate calcula din pH în orice punct al curbei de titrare a unui aminoacid, dacă concentrațiile speciilor acceptoare şi donoare de protoni sunt cunoscute.

La pH = 6,02, este un punct de inflexiune între cele două trepte ale curbei de titrare a alaninei. La acest pH, molecula nu prezintă sarcină electrică netă şi nici nu migrează în câmpul electric, este pH_i. $PH_i = ½(pK_1' + pK_2')$.

În figura 8.5., se prezintă curba de titrare difazică a alaninei (1). Fiecare treaptă prezintă un punct de echivalență (pK'_1 = 2,34 şi pK'_2 = 9,69), unde modificarea pH-ului este minimă când se adaugă cantități crescute de OH^-.

Aspectul curbei de titrare poate fi exprimat prin ecuația Henderson – Hasselbalch, care este o transformare logaritmică a relației pentru constanta de disociere (1):

$$K' = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad \text{din care,} \quad H^+ = K' \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Luând logaritmul cu semn negativ pentru ambele părți ale egalității:

$$-\lg [H^+] = -\lg K' - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Aceasta permite calcularea lui pK' pentru orice acid din raportul molar al speciilor donoare şi acceptoare de electroni la un anumit pH, de a calcula pH-ul unei perechi conjugate acid – bază la un anumit pK'. Când concentrațiile donorului şi acceptorului de electroni sunt egale, pH-ul este egal cu pK'.

Scanned with OKEN Scanner

Substituind $-\lg[H^+]=pH$ şi $-\lg K' = pK'$ se obtine:

$$pH = pK' + \lg\frac{[A^-]}{[HA]}$$ sau într-o formă mai generală

$$pH = pK' + \lg\frac{[\text{acceptor de protoni}]}{[\text{donor de protoni}]}$$

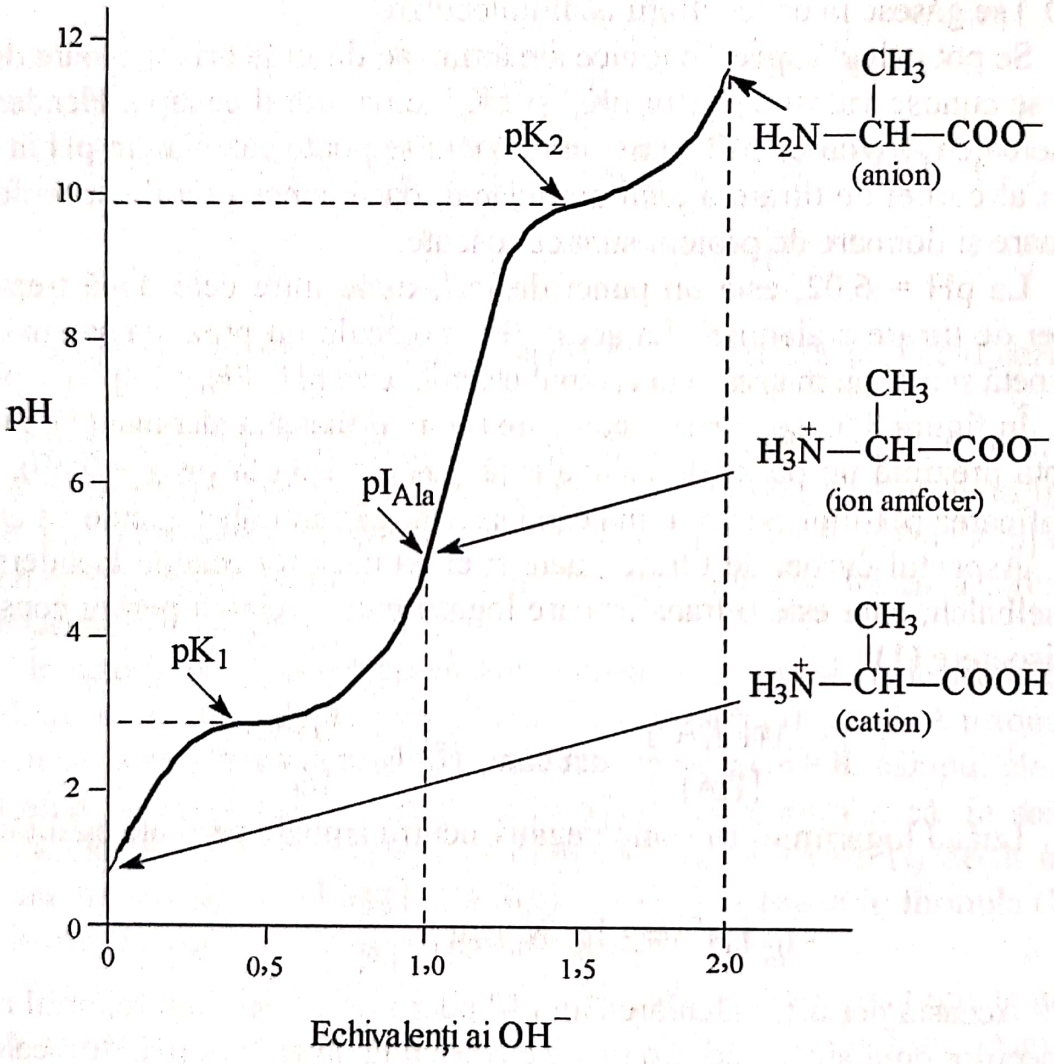


Fig. 8.5. Curba de titrare a alaninei

Cu ajutorul razelor X s-au determinat distanţele şi unghiurile interatomice în molecula de glicină cristalizată. După cum se vede din figura 8.6. (2), cele două distanţe C – O de 1,25Å şi 1,27Å sunt egale între ele, în limita erorilor experimentale, şi egale cu distanţa C–O din ionul carboxil (1,27Å), dar mult deosebite de distanţele C – O din carboxilul neionizat.

Scanned with OKEN Scanner

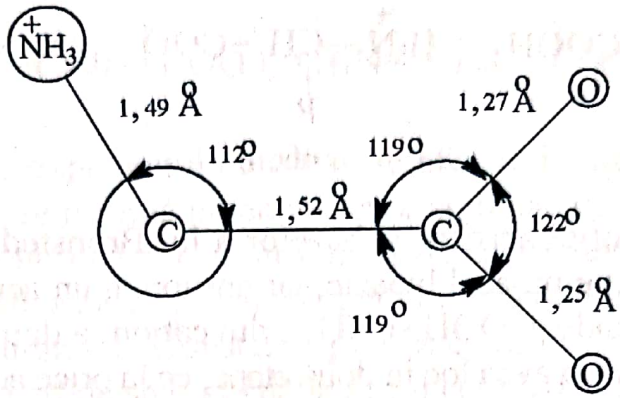


Fig. 8.6. Distanțe interatomice şi unghiuri în molecula glicinei determinate cu ajutorul razelor X

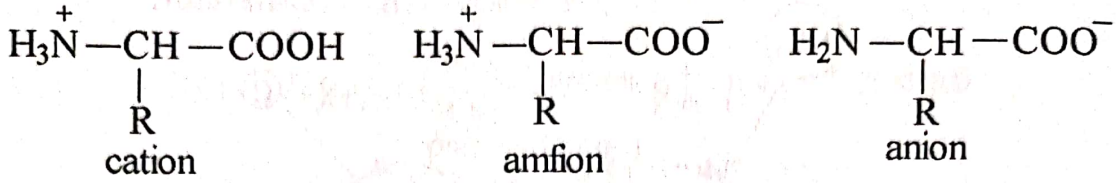
Pe baza cercetării unui număr mare de substanțe cristalizate, s-a ajuns la concluzia că cele trei tipuri de legături chimice ce pot apărea într-un cristal se deosebesc între ele prin distanțele lor. Cea mai scurtă este legătura covalentă, care este şi cea mai puternică. Legăturile covalente dintre elementele din perioada a doua a sistemului periodic al elementelor (C, N, O, F, Li, Be, B) variază între 1,2 şi 1,8Å între ele prin distanțele lor. Ionii monoatomici ai elementelor din perioada a doua, care se găsesc în cristalele ionice, variază cu distanțe de 2,0 – 2,5Å, unii față de alții. Cele mai mici distanțe între moleculele unui cristal molecular, unite prin forțe van der Waals, sunt de 3,3 – 4,0Å.

Aminoacizii conțin, în centre diferite ale moleculei, sarcini electrice de semn contrar şi au momente electrice mari. De aceea, aceştia măresc constanta dielectrică a apei în care sunt dizolvați.

În cazul aminoacizilor, contracția de volum ce se produce la dizolvarea lor în apă (electrostricția) este deosebit de mare. Astfel, dacă se dizolvă în apă un mol de glicină care are 75 g şi un volum de 47 ml, soluția rezultată creşte în volum doar cu 43,5 ml. Aceasta se explică prin faptul că se stabilesc forțe puternice de tip ioni–dipoli între dizolvant şi dizolvat, ceea ce confirmă caracterul ionic al aminoacizilor.

Într-o soluție apoasă a unui aminoacid monoaminic şi monocarboxilic, există următorii ioni (moleculele neutre, H_2N — CH(R) — COOH, sunt într-o concentrație atât de mică, încât pot fi neglijate):

Scanned with OKEN Scanner



Conform teoriei acizilor şi bazelor a lui Brönsted, „cationul" din formula de mai sus este un acid bibazic, iar amfionul, un acid monobazic. Dintre cele două grupe acide, COOH şi NH_3^+, din cation, a doua este cea mai puternic acidă. Ionizarea va avea loc în două etape, ca la orice acid dicarboxilic (2):

$$H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH + H_2O \rightleftharpoons H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^- + H_3O^+ \quad (1)$$

$$H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^- + H_2O \rightleftharpoons H_2N-CHR-COO^- + H_3O^+ \quad (2)$$

Constantele de ionizare ale celor două grupe acide se vor reprezenta, conform legii maselor, prin următoarele ecuaţii, în care soluţia este considerată suficient de diluată, pentru ca activităţile să poată fi înlocuite prin concentraţii:

$$K_1 = \frac{(H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-)(H^+)}{(H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH)} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{(NH_2-CHR-COO^-)(H^+)}{(H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-)} \quad (4)$$

Prin logaritmare, ecuaţia (3) devine:

$$\log K_1 = \log(H^+) + \log \frac{(H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-)}{(H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH)} \quad (5)$$

Dacă se înlocuieşte $-\log(H^+)$ cu pH şi $-\log K_1$ cu pK_1, se obţine:

$$pK_1 = pH - \log \frac{(H_3\overset{+}{N}-CHR-COO^-)}{(H_3\overset{+}{N}-CHR-COOH)} \quad (6)$$

Din această ecuație, rezultă că atunci când raportul concentrațiilor:

$$(H_3\overset{+}{N}—CHR—COO^-)/(H_3\overset{+}{N}—CHR—COOH)$$

este egal cu unitatea, exponentul de aciditate pK_1 va fi egal cu pH. Pentru a se afla mărimea pK_1, se titrează potențiometric aminoacidul cu acid clorhidric și se înscrie într-o diagramă pH-ul, în funcție de cantitatea de acid adăugată. Se constată că pK_1 este egal cu pH-ul soluției în momentul în care aminoacidul este neutralizat pe jumătate. Constanta pK_2 se află, în mod similar, titrând aminoacidul cu hidroxid de sodiu până la semineutralizare și măsurând pH-ul acestei soluții (2).

Dacă o soluție apoasă de aminoacizi monoaminomonocarboxilici ar conține numai amfioni, $NH_3^+ — CHR — COO^-$, soluția ar avea același pH, ca și apa pură. Soluțiile de aminoacizi sunt slab acide, deoarece grupa carboxilică este mai ionizată decât grupa aminică, deci soluțiile conțin o cantitate mică de ioni de hidrogen și anioni, $NH_2 — CHR — COO^-$, alături de anfioni în mare exces. Dacă se adaugă un acid, echilibrul de ionizare se deplasează, astfel încât se formează cationi, $H_3N^+ — CHR — COOH$, pe seama anionilor. Se numește *punct izoelectric*, pH_i, al unui aminoacid, acea concentrație a ionilor de hidrogen, la care soluția sa conține anioni și cationi ai aminoacidului în proporție egală.

Ecuațiile (3) și (4) se pot scrie în forma:

$$(H_3\overset{+}{N}—CHR—COOH) = \frac{(H_3\overset{+}{N}—CHR—COO^-)(H^+)}{K_1}$$

$$(NH_2—CHR—COO^-) = \frac{(H_3\overset{+}{N}—CHR—COO^-)K_2}{(H^+)}$$

Egalând, se obține condiția punctului izoelectric:

$$(H^+)^2 = K_1K_2 \text{ sau } (H^+) = \sqrt{K_1K_2} \text{ de unde: } pH_i = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2)$$

Solubilitatea aminoacizilor este minimă la punctul izoelectric. Proprietatea aceasta poate servi la determinarea punctului izoelectric. De aceea, se trasează curbele solubilității aminoacidului în soluții acide și bazice, la

diferite valori de pH. Punctul de întretăiere a celor două curbe corespunde punctului izoelectric.

În tabelul 8.4., se dau constantele de aciditate şi punctele izoelectrice ale unor aminoacizi.

Tabelul 8.4.

Constantele de aciditate şi punctele izoelectrice ale unor aminoacizi (2)

Aminoacidul	PK_1	PK_2	PK_3	pH_i
Glicină	2,35(COOH)	9,78(NH_3^+)	-	6,1
Alanină	2,34(COOH)	9,87(NH_3^+)	-	6,1
Leucină	2,36(COOH)	9,60(NH_3^+)	-	6,0
Serină	2,21(COOH)	9,15(NH_3^+)	-	5,7
Triptofan	2,38(COOH)	9,39(NH_3^+)	-	5,9
Acid asparagic	2,09(COOH)	3,87(COOH)	9,82(NH_3^+)	3,0
Acid glutamic	2,19(COOH)	4,28(COOH)	9,66(NH_3^+)	3,2
Tirozină	2,20(COOH)	9,11(NH_3^+)	10,1(OH)	5,7
Cisteină	1,96(COOH)	8,18(NH_3^+)	10,3(SH)	5,1
Arginină	2,02(COOH)	9,04(NH_3^+)	12,5(guanid.)	10,8
Lizină	2,18(COOH)	8,95(α-NH_3^+)	10,5(ε-NH_3^+)	9,7
Histidină	1,77(COOH)	6,20(imidazol)	9,20(NH_3^+)	7,6

Nici unul din aminoacizii ce se găsesc în proteine nu prezintă absorbție în vizibil. Tirozina, triptofanul şi fenilalanina absorb semnificativ în ultraviolet (fig. 8.7.).

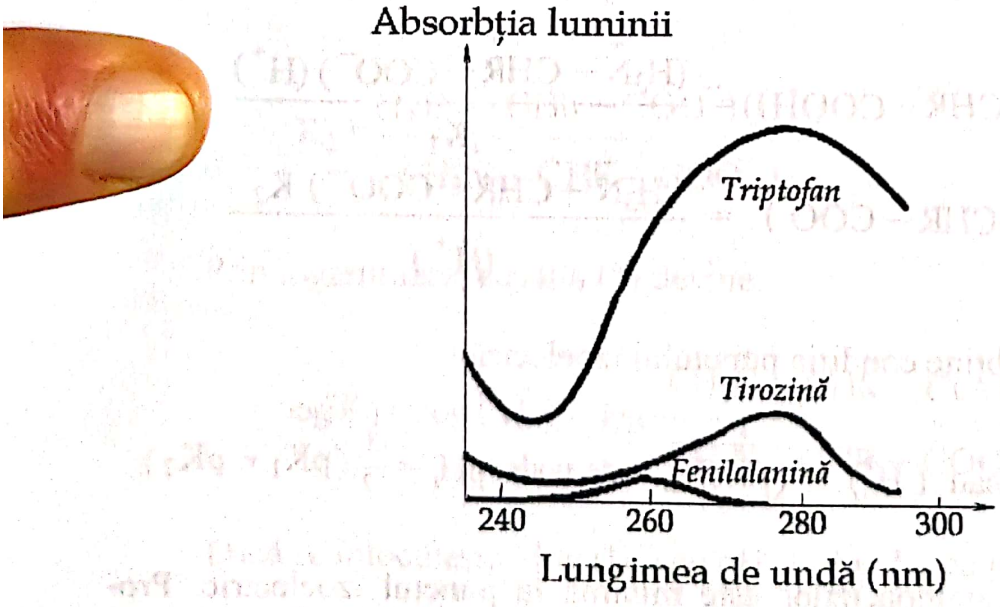


Fig. 8.7. Spectrul de absorbție în ultraviolet al triptofanului, tirozinei şi al fenilalaninei (1)

Deoarece majoritatea proteinelor conţin tirozină, măsurarea absorbţiei luminii la 280 nm cu un spectrofotometru este o metodă rapidă de estimare a conţinutului de proteine dintr-o soluţie. Cistina are o absorbţie slabă la 240 nm, datorită grupării sale disulfidice.

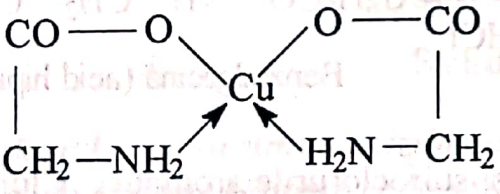
Toţi aminoacizii absorb în ultraviolet la < 220 nm.

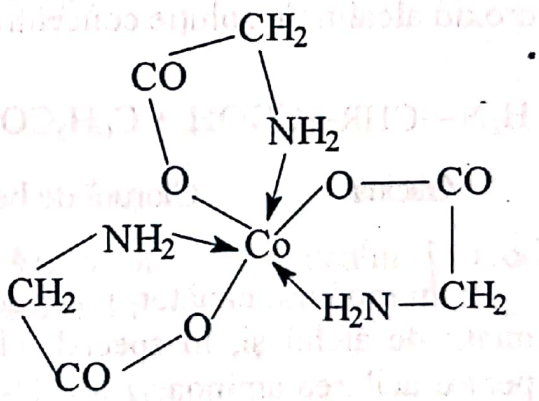
8.3. PROPRIETĂŢILE CHIMICE ALE AMINOACIZILOR

Aminoacizii formează săruri atât cu acizii tari, cât şi cu bazele tari.

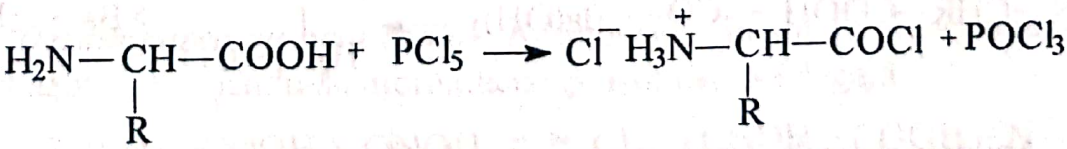
Din cauză că soluţiile de aminoacizi nu-şi variază pH-ul când li se adaugă un acid sau o bază, nu pot fi titraţi prin metodele acidimetrice sau alcalimetrice curente (2). Dacă se adaugă soluţiilor un exces de formaldehidă, titrarea cu baze şi cu indicatorii obişnuiţi decurge fără dificultăţi. Formaldehida reacţionează cu grupele aminice ale aminoacizilor, dând baze Schiff, de tipul $CH_2 = N - CHR - COOH$, în care bazicitatea grupei aminice este mult diminuată.

α–Aminoacizii dau cu cuprul, cobaltul şi alte metale grele, săruri complexe colorate foarte greu solubile şi stabile. Mai jos se prezintă complecşi interni ai glicinei cu cupru şi cobaltul:





Derivaţi funcţionali ai grupei carboxil. Aminoacizii în clorura de acetil trec, prin tratare cu pentaoxid de fosfor în cloruri acide, care se cunosc numai sub formă de clorhidraţi foarte reactivi:



Prin esterificarea directă, cu metanol sau etanol, a aminoacizilor saturaţi cu acid clorhidric gazos, se obţin esteri sub formă de clorhidraţi. Esterii aminoacizilor au un caracter bazic, grupa carboxil fiind blocată:

$$H_3N^+ — CHR — COOH + HO — R' \rightarrow H_3N^+ — CHR — COOR' + H_2O$$

Sub acţiunea amoniacului, aminoacizii dau naştere la amide:

$$H_2N — CHR — COOH + NH_3 \rightarrow H_2N — CHR — CONH_2 + H_2O$$

Reacţia poate avea loc şi cu o amină:

$$H_2N — CHR — COOH + H_2N — R' \rightarrow H_2N — CHR — CO — NH — R'$$

Esterii inferiori ai aminoacizilor sunt lichide care distilează sub presiune redusă. Prin încălzire, aceştia se transformă în dicetopiperazine şi în polipeptide.

Derivaţi funcţionali ai grupei amino. Acilarea. Prin tratarea aminoacizilor cu cloruri acide, în special cu clorură de benzoil, în prezenţa unui hidroxid alcalin, în soluţie concentrată, se obţin N-acil derivaţi:

$$\underset{\text{Glicină}}{H_2N—CHR—COOH} + \underset{\text{Clorură de benzoil}}{C_6H_5COCl} \xrightarrow[-HCl]{} \underset{\text{Benzoilglicină (acid hipuric)}}{C_6H_5CO—NH—CH_2—COOH}$$

În mod asemănător, reacţionează şi sulfoclorurile aromatice. Cloroformiaţii de alchil şi, în special, cloroformiatul de benzil sunt mult utilizaţi pentru acilarea aminoacizilor. N-formil derivaţii se obţin prin formilare directă cu acid formic.

În prezenţa hidroxizilor alcalini sau alcalino-pământoşi, aminoacizii se combină cu dioxidul de carbon şi dau săruri carboxi-aminoacizi:

$$H_2N—CHR—COOH + CO_2 + Ba(OH)_2 \longrightarrow \begin{matrix} HN—COO \\ | \quad\quad > Ba \\ H_2C—COO \end{matrix} + 2H_2O$$

Acilarea duce la pierderea caracterului bazic al grupei aminice, ceea ce face ca aminoacizii acilaţi de tipul benzoil-glicinei să se comporte ca acizi de tăria acizilor carboxilici obişnuiţi.

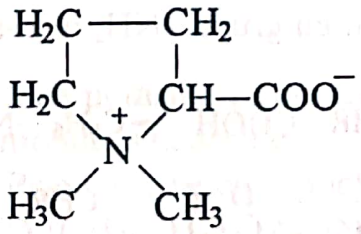
Alchilarea aminoacizilor. Betainele sunt derivaţii metilaţi cuaternari ai aminoacizilor şi se pot obţine prin alchilarea lor la grupa aminică, printr-o tratare cu iodură sau sulfat de metil, în prezenţa unui hidroxid alcalin. Cel mai cunoscut este derivatul trimetilat al glicinei, care se poate obţine şi din acidul cloracetic şi trimetilamină:

$$HOOC-CH_2Cl + N(CH_3)_3 \longrightarrow HOOC-CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3Cl^-$$

$$\xrightarrow[(NaOH)]{-HCl} {}^-OOC-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Betaina glicinei

În plante şi animale, se găsesc diferiţi derivaţi cuaternari ai aminoacizilor, dintre care se menţionează: betaina histidinei (*hercinina)* din unele ciuperci, betaina triptofanului (*hipaforina)* din diferite plante exotice şi betaina prolinei (*stahidrina)* din unele plante, dintre care unele sunt cunoscute ca vindecătoare de răni (iarba de răni, stânjenei).



Stahidrina

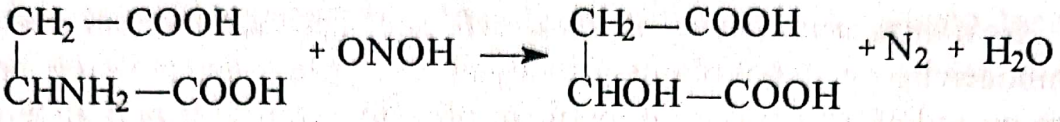
Condensarea aminoacizilor cu aldehidele. În mediu alcalin, în mod analog, cu aminele primare se formează baze Schiff:

$$R-\underset{\underset{COOH}{|}}{CH}-NH_2 + O=C\begin{matrix}H\\H\end{matrix} \xrightarrow[NaOH]{-H_2O} R-\underset{\underset{COOH}{|}}{CH}-N=CH_2$$

Bază Schiff

Dezaminarea cu acid azotos. Aminoacizii, în soluţie, reacţionează cu acidul azotos, formându-se hidroxiacizi şi azot care se degajă:

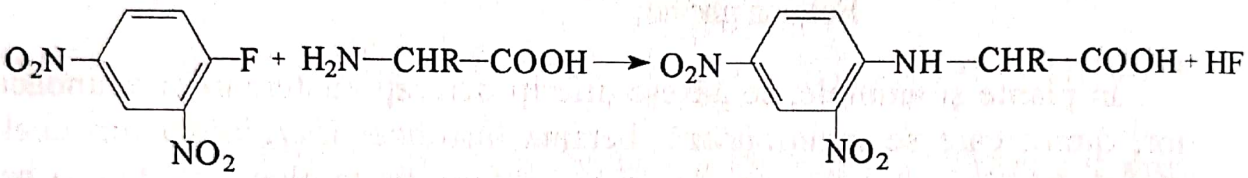
$$\underset{\text{Alanină}}{CH_3-CHNH_2-COOH} + ONOH \longrightarrow CH_3-CHOH-COOH + N_2 + H_2O$$



Acid asparagic

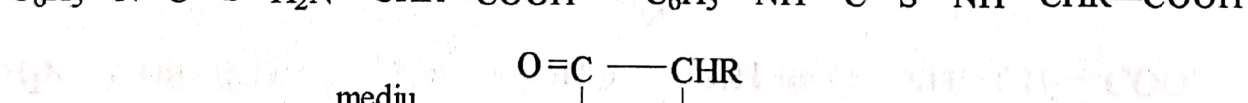
Esterii α–aminoacizilor dau, cu acidul azotos, diazoesteri, dintre care cel mai cunoscut este esterul diazoesteric, $N_2CH—COOC_2H_5$.

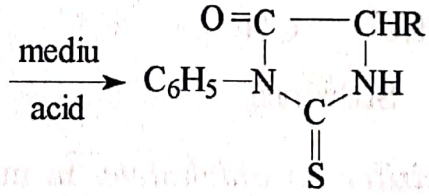
***Reacţia cu dinitrofluorbenzen* (*reacţia Sanger*)** serveşte la separarea şi recunoaşterea aminoacizilor. Reacţia are loc în mediu slab alcalin şi rezultă dinitro-fenilderivaţi de culoare galbenă:



Prin hidroliză acidă, se eliberează aminoacidul în stare pură.

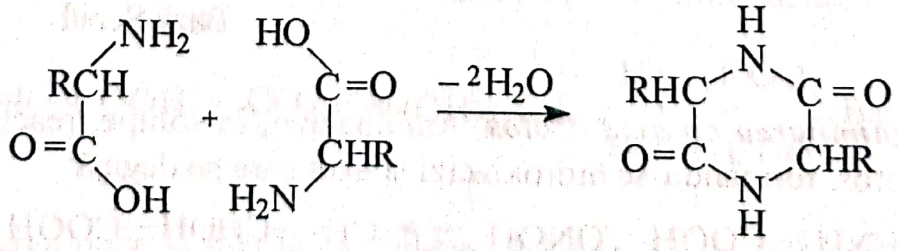
***Reacţia cu fenilizocianat* (*reacţia Edman*).** Reacţia constă din condensarea fenilizocianatului cu grupa $-NH_2$ a α–aminoacizilor sau peptidelor:





3 –fenil– 5 –tiohidanteina acidului aminat

Descompunerea termică. α–Aminoacizi dau, prin încălzire, mai ales în prezenţa glicolului, derivaţi ai 2, 5-dicetopiperazinei:

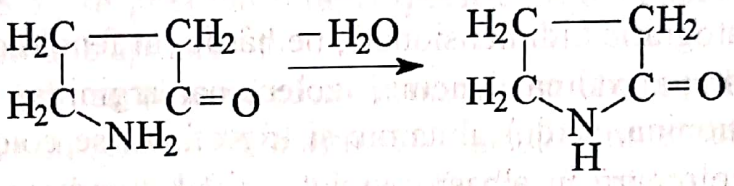


Aceste substanțe, care se numesc și „anhidride" ale aminoacizilor, se obțin cu ușurință din esteri ai α–aminoacizilor, prin eliminare de alcool la încălzire.

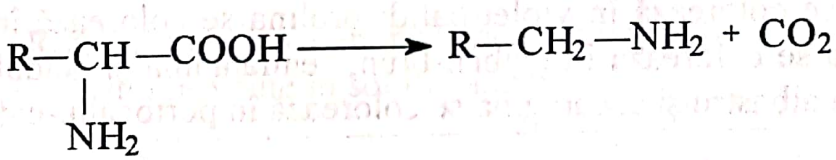
β–Aminoacizii, la încălzire, pierd ușor amoniac și trec în acizi nesaturați:

$$H_2N—CH_2—CH_2—COOH \rightarrow NH_3 + CH_2 = CH—COOH$$

γ– și δ–Aminoacizii, prin încălzire, pierd apă și trec în lactame:

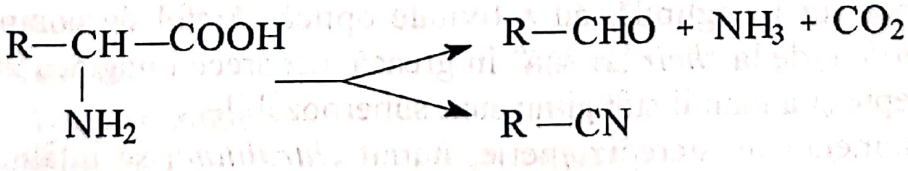


Distilarea uscată a aminoacizilor, în special, în prezența hidroxidului de bariu, produce decarboxilarea cu formare de amine primare:



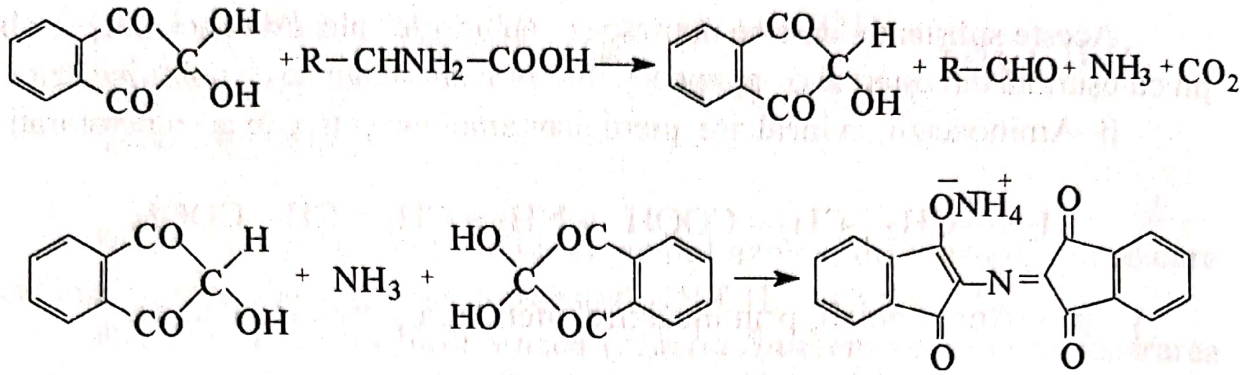
Prin topire cu hidroxid de potasiu, aminoacizii se degradează puternic și se formează acizi grași, amoniac sau amine.

Degradări oxidative. Prin oxidare cu hipocloriți alcalini, persulfați, p-toluenclorsulfonamidă sodată ($CH_3C_6H_4SO_2NclNa$), cunoscută sub denumirea de *cloramină* T etc., aminoacizii trec în aldehide imediat inferioare sau chiar nitrili:



Ninhidrina (*tricetohidrinden-hidrat*), în prezența α–aminoacizilor, dă o colorație albastru intensă, pentru care motiv se folosește ca indicator la determinările cromatografice ale acestora. Mai întâi, aminoacizii sunt degradați oxidativ la aldehide, iar colorantul provine din condensarea cetoalcoolului care se formează la reducerea ninhidrinei cu o nouă moleculă de ninhidrină și, probabil, cu o moleculă de amoniac:

Scanned with OKEN Scanner



La cromatografia bidimensională, pe hârtie, în fenol-colidină (trimetil-piridină) α–alanina, valina, leucina, izoleucina, arginina, serina, ornitina, glutamina, metionina, acidul glutamic şi triptofanul se colorează în violet; β–alanina se colorează în albastru-violet; acidul asparagic se colorează în albăstrui-violet; histidina şi tirozina se colorează în verde-violet; glicina şi citrulina se colorează în roşu-violet; lizina se colorează în violet-închis; hidroxilizina se colorează în violet-palid; prolina se colorează în galben; hidroxiprolina se colorează în galben-brun; fenilalanina şi acidul cisteinic se colorează în albastru şi asparagina se colorează în portocaliu-cafeniu (3).

8.4. STEREOCHIMIA AMINOACIZILOR

În afară de glicină, toţi α–aminoacizii rezultaţi la hidroliza proteinelor, au cel puţin un atom de carbon asimetric, rotesc planul luminii polarizate, sunt compuşi optic activi şi pot exista sub formă de enantiomeri. Toţi compuşii care sunt capabili să existe sub două forme, care nu sunt superpozabile cu imaginea lor în oglindă, au activitate optică. Astfel de compuşi se numesc *chiralici*, de la *cheir* „mână“ în greacă, deoarece imaginea în oglindă a mâinii drepte şi a mâinii stângi nu sunt superpozabile.

Fenomenul de stereoizomerie, numit *chiralitate*, se întâlneşte la toţi compuşii care au un atom de carbon asimetric, adică un atom de carbon legat cu patru radicali diferiţi. Din cauza naturii tetraedrice a orbitalilor sp^3 ai atomului de carbon, cei patru substituenţi diferiţi pot ocupa două aranjamente diferite în spaţiu, în jurul atomului de carbon, rezultând doi stereoizomeri sau enantiomeri.

Aşa după cum s-a mai arătat, în afară de glicină, care nu are un atom de carbon asimetric, toţi ceilalţi aminoacizi au un atom de carbon asimetric şi doi enantiomeri, iar izoleucina şi treonina au câte doi atomi de carbon asimetrici şi câte patru enentiomeri.

Scanned with OKEN Scanner

Numărul stereoizomerilor posibili ai unui compus este 2^n, unde n reprezintă numărul de atomi asimetrici.

Activitatea optică este exprimată cantitativ ca rotaţie specifică $[\alpha]^{25}_D$:

$$[\alpha]^{25}_D = \frac{\text{rotaţia observată, grade x 100}}{\text{lungimea drumului optic, dm x concentraţia, g / 100 ml}}$$

În tabelul 8.5., se prezintă rotaţia specifică a unor aminoacizi obţinuţi din proteine în soluţie apoasă. (1).

Din tabelul 8.5., se observă că unii aminoacizi obţinuţi din proteine sunt dextrogiri (notaţi cu semnul +) şi alţii sunt levogiri (notaţi cu semnul –). Pe baza datelor din tabelul 8.5., se poate afirma că rotaţia specifică a unui aminoacid depinde de structura radicalului R.

Tabelul 8.5.

Rotaţia specifică a unor aminoacizi obţinuţi din proteine în soluţie apoasă

Aminoacidul	Rotaţia specifică $[\alpha]^{25}_D$
L–Alanină	$+1,8^0$
L–Arginină	$+12,5^0$
L–Leucină	$-11,0^0$
L–Izoleucină	$+12,4^0$
L–Fenilalanină	$-34,5^0$
L–Acid glutamic	$+12,0^0$
L–Histidină	$-38,5^0$
L–Acid asparagic	$-5,0^0$
L–Metionină	$-10,0^0$
L–Lizină	$+13,5^0$
L–Serină	$-7,5^0$
L–Prolină	$-86,2^0$
L–Treonină	$-28,2^0$
L–Triptofan	$-33,7^0$
L–Valină	$+5,6^0$

Scanned with OKEN Scanner

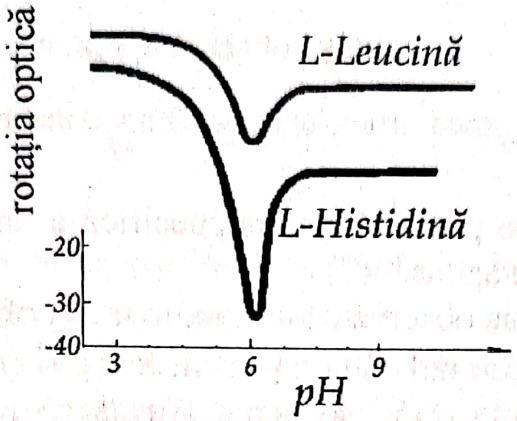


Fig. 8.8. Variația rotației optice a aminoacizilor în funcție de pH (1)

În figura 8.8., se observă că valoarea rotației specifice a unui aminoacid variază cu pH-ul la care se determină. În general, aminoacizii monoaminomonocarboxilici levogiri prezintă o rotație specifică maximă când sunt la pH-ul izoelectric.

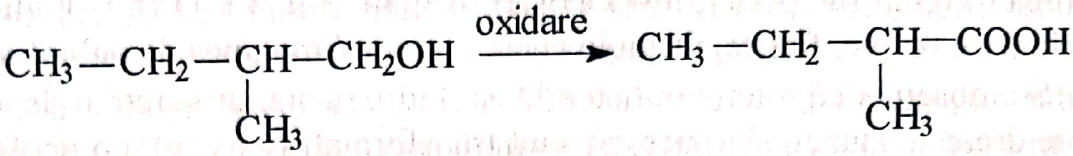
8.4.1. CONFIGURAȚIA AMINOACIZILOR

Teoria stereochimică arată ce simetrie trebuie să aibă o moleculă, pentru a exista sub formă de izomeri optic activi, fără a indica care din formele de configurație revine fiecăruia din izomerii optici.

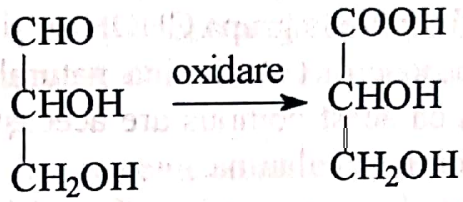
Nu sunt reguli după care se poate prevedea sensul în care se rotește planul luminii polarizate pentru un compus cu o anumită configurație. De exemplu, prin oxidarea alcoolului amilic levogir, se formează acid (+)–α–metilbutiric, iar prin oxidarea (+)–gliceralaldehidei se formează acid (–)gliceric.

Oxidarea grupelor – CH_2OH și – CH_2O din acești compuși nu schimbă configurația atomului de carbon asimetric vecin, care nu ia parte la reacție.

Scanned with OKEN Scanner



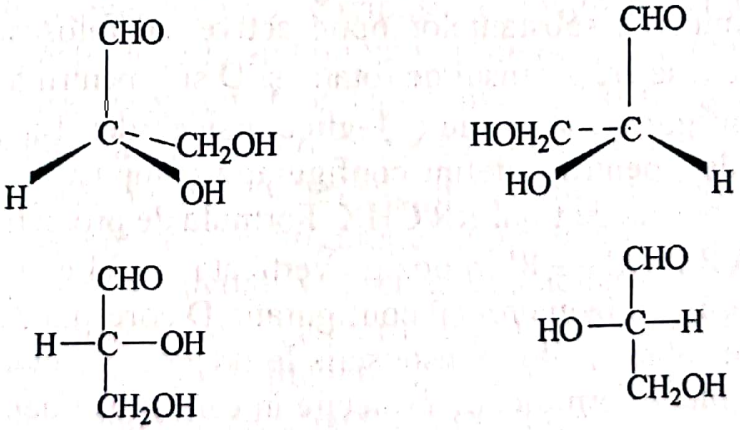
(—)– Alcool amilic Acid (+) α–metilbutiric



(+)Glicerinaldehidã Acid (–) gliceric

Formarea unei sări poate schimba sensul rotației optice; sarea de sodiu a acidului (+)–lactic este levogiră, deşi are aceeaşi configurație cu a acidului liber, care este dextrogir.

Cercetarea configurațiilor monozaharidelor a condus la stabilirea relațiilor ce există între acestea şi configurația (+)–glucozei. (+)–Glucoza are patru atomi de carbon asimetrici şi, în consecință, structura sa este prea complicată, pentru a servi ca standard pentru corelarea configurațiilor compuşilor optic activi. De aceea, s-a propus pentru acest scop, glicerinaldehida care are un singur atom de carbon asimetric.



D(+)–Glicerialdehidă L(–)–Glicerinaldehidă

Fig. 8.9. Formulele de configurație şi de proiecție ale celor două glicerinaldehide enantiomere

S-a considerat (+)–glicarinaldehida drept configurația pe care o are grupa OH în partea dreaptă, atunci când molecula tetraedrică este orientată

cu grupa CHO în sus şi cu grupa CH_2OH în spate (fig. 8.9.) (2); (–)–gliceri-naldehidei îi revine, firește, formula enantiomorfă (imaginea de oglindire).

S-a observat că rotația optică a D–α–hidroxiacizilor suferă o deplasare spre dreapta, atunci când aceştia sunt transformați în esteri şi o deplasare în acelaşi sens mai pronunțată, când sunt transformați în amine. De aici rezultă, de exemplu, că acidul mandelic natural levogir are aceeaşi configurație ca acidul (–) lactic şi ca acidul (–) gliceric şi face, deci, parte, ca şi aceştia, din seria D. Aceeaşi configurație la grupa CHOH au şi următorii compuşi (2).

Aplicată la un aminoacid, (+) alanina naturală, metoda comparației optice duce la concluzia că acest compus are aceeaşi configurație ca acidul L(+) lactic, care este, deci, L (+) alanina.

S-a stabilit prin metoda comparației optice că (+)-alanina naturală, obținută din proteine are aceeaşi configurație cu acidul (+)–lactic. Cum este dovedit pe cale directă că acest acid are aceeaşi configurație ca L–gliceri-naldehida, rezultă că alanina naturală dextrogiră are configurație L.

Prin transformări chimice ce nu comportă substituții la atomul de carbon asimetric s-a determinat, pornindu-se de la (–)–serină, înrudirea configurativă a acestui aminoacid cu (–)–cisteina şi cu (+)–alanina, ca şi cu alți aminoacizi. S-a mai stabilit o înrudire configurativă similară între acidul L(–)–asparagic şi următorii aminoacizi naturali: (–)–leucina, (+)–valina, (–)–metionina, (–)–treonina, (+)–ornitina, (+)–lizina, (–)–prolina şi acidul (+)–glutamic. Prin asemenea metode, s-a ajuns la concluzia că majoritatea aminoacizilor naturali au aceeaşi configurație ca L–serina şi L–alanina (2).

La formularea substanțelor optic active, se folosesc simbolurile (+) sau (–) pentru a se arăta sensul de rotație şi D şi L pentru a se arăta înrudirea sterică cu configurația (+)– sau (–)–glicerinaldehidei: Literele D şi L se folosesc, mai ales, pentru a defini configurația compuşilor care conțin atomi de carbon asimetrici de tipul RR'CHX. Formula de proiecție se scrie cu catena principală R — C — R' în poziție verticală, astfel ca grupa cea mai oxidată R să apară sus. Izomerul cu configurația D corespunde formulei de proiecție, în care substituentul X este scris la dreapta, iar izomerul cu configurația L corespunde formulei de proiecție în care substituentul X este scris la stânga (fig. 8.9.).

Când un compus conține doi sau mai mulți atomi de carbon asimetrici, s-a stabilit, în mod convențional, care dintre atomii de carbon asimetrici determină apartenența la una dintre cele două serii sterice, D şi L. Astfel, pentru aminoacizi, apartenența la seriile D sau L este hotărâtă de atomul de carbon asimetric vecin cu grupa carboxilică şi de care este legată grupa NH_2.

Scanned with OKEN Scanner

Monozaharidele se încadrează în seria D sau L după configurația atomului de carbon asimetric cel mai depărtat în catenă de gruparea carbonil.

Nu trebuie să se uite că această încadrare a compușilor optic activi și seriile sterice D și L nu decurge dintr-o necesitate logică, ci se bazează pe o convenție destinată unei mai bune clasificări și nomenclaturi a substanțelor (2).

Atunci când doi compuși optic activi cu structură similară, supuși unei transformări chimice analoage (esterificare, amidificare, hidroliză etc.), suferă o deplasare mare a rotației optice în același sens, aceşti compuși au, probabil, aceeași configurație, observație care se bazează pe metoda comparației optice.

Toți aminoacizii din proteine aparțin seriei stereochimice L. Deşi în proteine sunt prezenți numai L-aminoacizi, se găsesc numeroşi D-aminoacizi în celule sub alte combinații chimice. De exemplu, se găsesc în pereții celulari ai unor microorganisme sau fac parte din structura antibioticelor peptidice (gramicidina, actinomicina) (1).

Treonina obținută din hidrolizatele proteice este, convențional, numită L, dar imaginea ei în oglindă reprezintă forma D (1). Ceilalți doi stereoizomeri ai săi sunt diastereoizomeri sau forme alo, care, de asemenea, sunt imaginea în oglindă a unuia față de celălalt (figura 8.10).

Cistina, forma oxidată a cisteinei, conține doi atomi de carbon asimetrici și poate exista în formele L, D și mezo (un izomer în care atomii de carbon asimetrici sunt imaginile în oglindă ale unuia față de celălalt) (fig. 9.10), dar care nu există în natură.

Natura stereoizomerilor unor compuși ce conțin mai mulți atomi de carbon asimetrici poate duce la ambiguități și, de aceea, trebuie luat în seamă sistemul de notare a stereoizomerilor după convenția Cohn – Ingold – Prelog.

Datorită faptului că nu există o relație simplă între configurație și sensul de rotație a planului luminii polarizate, a devenit necesară introducerea unui mod univoc de notare a configurației moleculelor chiralice. Potrivit convenției R.S. Cahn, C.K. Ingold, V. Prelog, se stabileşte, mai întâi, o ordine de prioritate a substituenților, cu ajutorul unor reguli prezentate mai jos.

Se admite că cei patru substituenți, a, b, c, d, de la atomul de carbon asimetric corespund ordinei de prioritate descrescândă a > b > c > d. Semnul > se va citi: „are prioritate față de". Se privește molecula din partea opusă grupei cu prioritatea cea mai scăzută (în cazul de față d) (a se vedea reprezentarea de mai jos).

Dacă pornim din *a* (substituentul cu prioritatea cea mai avansată) către *b* și apoi către *c*, obținem sensul de rotație al acelor ceasornicului, con-

Scanned with OKEN Scanner

figurația atomului asimetric se notează cu *R* (de la *rectus* = dreapta, în limba latină); în caz contrar, notația folosită este *S* (*sinister* = stânga):

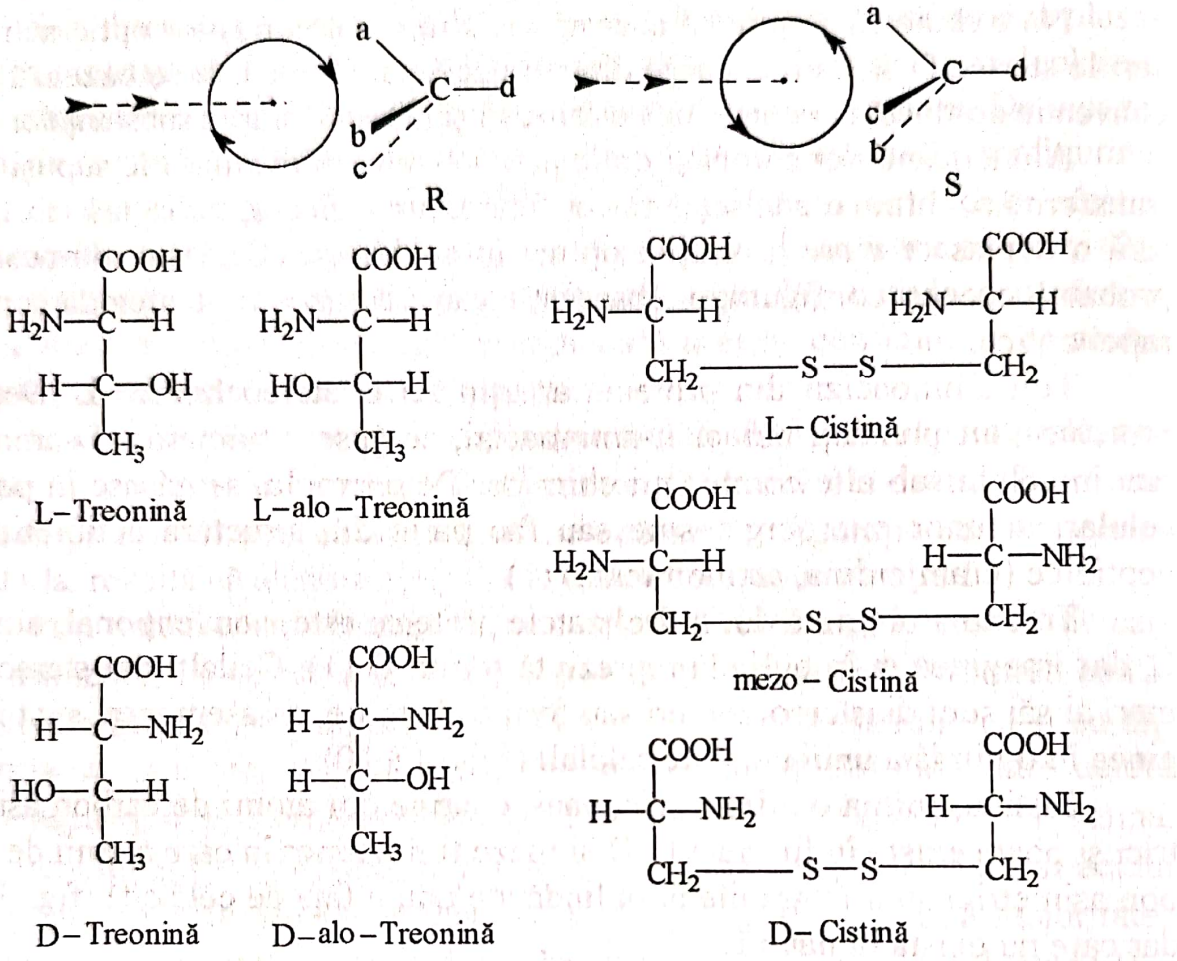


Fig. 8.10. Stereoizomerii treoninei şi ai cistinei

Principalele reguli pentru stabilirea priorității substituenților sunt următoarele:

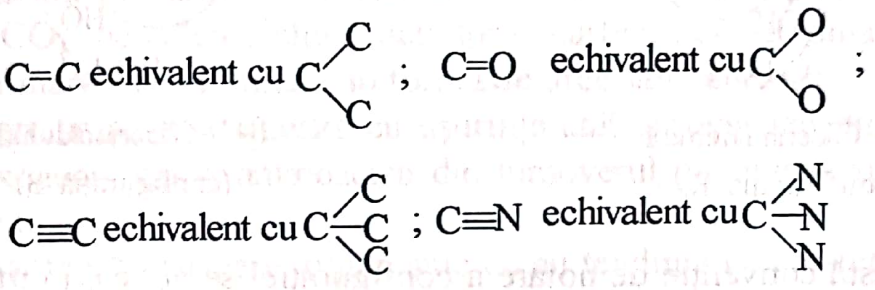
1. Se iau în considerare numai atomii legați direct de atomul asimetric. Prioritatea substituenților scade în ordinea numerelor atomice ale acestor atomi. De exemplu, în H_3C — CHClBr, numerele atomice ale celor patru atomi legați direct de atomul de carbon asimetric scad în ordinea Br > Cl > C > H. Ordinea de prioritate a substituenților este, deci, Br > Cl > CH_3 > H.

2. Dacă ordinea de prioritate a doi sau mai mulți substituenți nu poate fi stabilită cu ajutorul primei reguli, ținând seama de atomii direct legați de atomul de carbon asimetric, se trece la examinarea atomilor direct legați de aceştia.

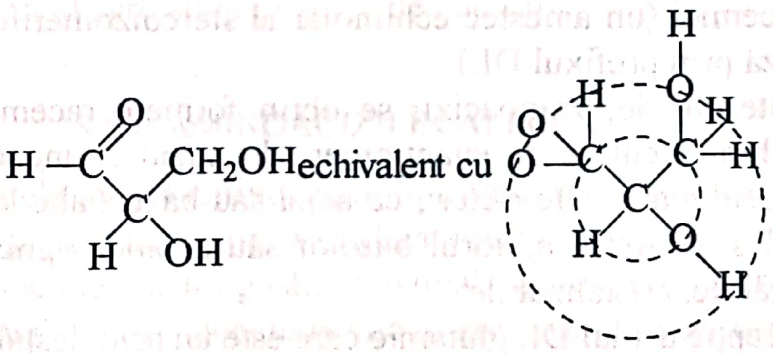
Fiecare dintre substituenți poate conține în acest strat unul sau mai mulți atomi. Vom considera cazul, mai frecvent întâlnit, în care substituenții conțin în stratul al doilea câte trei atomi. Ordinea de prioritate a doi substituenți ce conțin în acest strat atomii A, B, C, respectiv A', B', C' (ordinea

numerelor atomice fiind: $A \geq B \geq C$; $A' \geq B' \geq C'$) se stabileşte astfel: dacă $A > A'$, are prioritate substituentul care conţine în acest strat atomul A; dacă $A = A'$, dar $B > B'$, prioritatea este hotărâtă de atomul B; în cazul $A = A'$, $B = B'$, dar $C > C'$, prioritatea este impusă de atomul C. Dacă nici astfel prioritatea nu poate fi stabilită, se trece la următorul strat de atomi.

Legăturile duble şi triple se tratează ca şi cum atomul respectiv ar fi legat prin câte o legătură simplă de doi, respectiv trei atomi. Se consideră grupele:



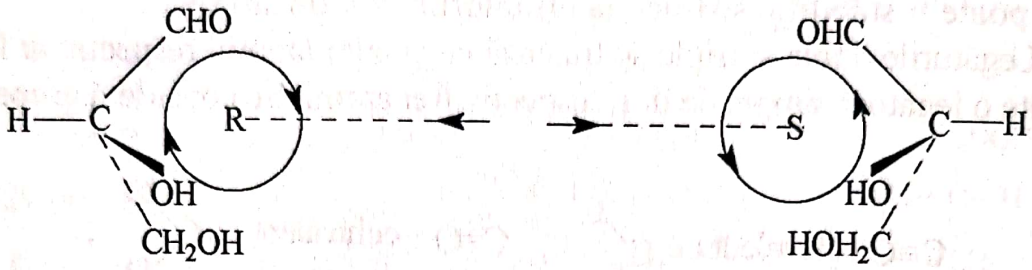
Pentru exemplificare, se va considera cazul glicerinaldehidei:



Atomii direct legaţi de atomul de carbon asimetric sunt: H, O, C. Numerele atomice scad în ordinea $O > C > H$, deci ordinea de prioritate a substituenţilor este: $OH > CH_2OH$, $CHO > H$. Pe baza regulii 1, nu se poate hotărî prioritatea substituenţilor CH_2OH şi CHO. Ţinând cont de regula 2, se compară următorul strat de atomi, adică O, O, H (corespunzând grupei CHO) cu O, H, H (din grupa CH_2OH: prima pereche de atomi fiind identici (O şi =), se compară următoarea pereche (= şi H). În aceasta, oxigenul are număr atomic mai mare decât hidrogenul, deci grupa CHO va avea prioritate faţă de CH_2OH. Ordinea de prioritate a substituenţilor în glicerinaldehidă este deci: $OH > CHO > CH_2OH > OH$.

Scanned with OKEN Scanner

Privind molecula din partea opusă atomului de hidrogen (substituentul cu prioritatea cea mai scăzută), se constată că (+)–glicerinaldehida corespunde configurației R, iar (–)-glicerinaldehida, configurației S (2):



(+)–Glicerinaldehidă (configurația R)

(–)–Glicerinaldehidă (configurația S)

Această convenție de notare a configurației se aplică, în mod similar, și la substanțele cu doi sau mai mulți atomi asimetrici și poate fi extinsă și la cazurile de izomerie optică fără atomi asimetrici (2).

Separarea enantiomerilor. La hidroliza proteinelor, se obțin frecvent aminoacizi racemici (un amestec echimolar al stereoizomerilor D și L, care se simbolizează prin prefixul DL).

Prin sintezele de aminoacizi, se obțin formele racemice, care sunt amestecuri echimoleculare de enantiomeri. În cazul aminoacizilor care se comportă, în cele mai multe cazuri, ca acizi sau baze slabe, compușii racemici nu pot fi scindați cu ajutorul bazelor sau acizilor optic activi, neformând săruri stabile, cristalizabile.

Face excepție acidul DL glutamic care este un acid destul de tare pentru a putea fi scindat prin intermediul sării sale de chinină.

Scindarea aminoacizilor racemici în enantiomeri se poate face prin acilarea lor la grupa aminică (de obicei, formilarea), care le mărește mult aciditatea și formarea de săruri cu baze optic active.

Pentru separarea aminoacizilor în enantiomeri, se pot folosi, de asemenea, o serie de metode biochimice. Astfel, se transformă, de exemplu, acidul DL-glutamic într-un ester și apoi acesta se hidrolizează cu enzime, ca papaina, chimotripsina, care atacă numai esterii formelor L. O altă metodă constă în hidroliza enzimatică cu acilaze sau carboxipeptidază a compușilor N-acilați ai DL-aminoacizilor; se obține L-aminoacidul, alături de D-acilaminoacid.

Scanned with OKEN Scanner

8.5. BIOCHIMIA AMINOACIZILOR

Aminoacizii la animalele superioare sunt constituenţi ai proteinelor necesare creşterii şi refacerii ţesuturilor şi precursori ai multor biomolecule ca: enzime, hormoni, unele vitamine etc. Ei servesc şi ca sursă de energie când sunt ingeraţi în cantităţi mai mari decât sunt necesari pentru refacerea proteinelor uzate sau pentru creştere. În acest ultim caz, sunt dezaminaţi, iar catena de atomi de carbon este convertită la glucoză (gluconeogeneză) sau oxidată la CO_2, pe calea ciclului acizilor tricarboxilici. Amoniacul rezultat de la dezaminare este eliminat sub formă de uree sau acid uric.

La vertebrate, se oxidează cu uşurinţă atât aminoacizii din proteinele ingerate (exogeni), cât şi aminoacizii din turnoverul proteinelor organismului propriu (endogeni).

La plantele superioare, organisme ce au tendinţa de creştere continuă, procesul de sinteză a aminoacizilor este prioritar.

Bacteriile nu oxidează sau oxidează puţin aminoacizii. Ele sunt mult mai active în sinteza aminoacizilor. Sunt şi bacterii care degradează aminoacizii, mai ales când sunt singura sursă de carbon.

8.5.1. AMINOACIZII ÎN ALIMENTAŢIE

Vertebratele ingeră aminoacizii, în primul rând, sub formă de proteine. Proteinele, ca şi peptidele, sunt hidrolizate până la aminoacizi de către enzimele proteolitice din tractul gastrointestinal, secretate de către stomac, pancreas şi intestinul subţire, deoarece numai aminoacizii sunt cei care participă la diferite procese metabolice.

Digestia proteinelor începe în stomac, unde *pepsina* este principala enzimă proteolitică. Ea este secretată sub forma zimogenului *pepsinogen* de către celulele specializate ale mucoasei stomacale. Pepsinogenul este convertit la pepsină de însăşi pepsina la pH-ul acid al sucului gastric, prin îndepărtarea a 42 de aminoacizi de la capătul N terminal al lanţului său polipeptidic. Pepsina are o specificitate foarte largă, dar atacă, de preferinţă, legăturile peptidice la care participă resturi de aminoacizi aromatici, dar şi metionina sau leucina, formând peptide mai mici şi o cantitate foarte mică de aminoacizi liberi.

Sucul pancreatic care se varsă în intestinul subţire conţine zimogenii: *chimotripsinogen, tripsinogen, procarboxipeptidazele A* şi *B* şi *proelastaza.* Chimotripsinogenul trece în chimotripsină activă, prin îndepărtarea din molecula sa a două dipeptide, sub acţiunea tripsinei şi a chimotripsinei libere.

Scanned with OKEN Scanner

Chimotripsina hidrolizează legăturile peptidice la care participă aminoacizii aromatici, în dreptul grupei lor carboxil.

Tripsinogenul este convertit la tripsină activă de către *enterochinază*, prin îndepărtarea unui hexapeptid N-terminal.

Tripsina hidrolizează legăturile peptidice la care participă lizina şi arginina, în dreptul grupei lor carboxilice.

Carboxipeptidaza A este o enzimă care conţine Zn_2^+ şi hidrolizează aproape orice tip de legături peptidice carbo-xilterminale. Carboxipeptidaza B scindează arginina sau lizina la C–terminal.

Proteinele ajunse în stomac sunt hidrolizate de pepsină, apoi, în intestinul subţire, de enzimele secretate de pancreas până la aminoacizi liberi şi peptide mici, iar peptidele mici sunt hidrolizate la aminoacizi de peptidaze secretate de mucoasa intestinală şi, mai ales, de *leucin aminopeptidaza*, o enzimă care conţine Zn^{2+} şi care eliberează aminoacizii N-terminali. Aminoacizii trec din intestin în sânge şi ajung în ficat, unde are loc cea mai mare parte a metabolismului lor, inclusiv degradarea (1).

Unii aminoacizi sunt indispensabili creşterii animalelor tinere şi funcţionării normale a organismului adult. Aceşti aminoacizi, numiţi esenţiali sau indispensabili, nu sunt sintetizaţi de organismul animal, ci sunt luaţi de către acesta din hrană. Alţi aminoacizi pot lipsi din hrană fără nici un inconvenient (tabelul 8.6.).

Tabelul 8.6.

Aminoacizii esenţiali şi neesenţiali pentru alimentaţie

Aminoacizi esenţiali		Aminoacizi neesenţiali
Neînlocuibili	Înlocuibili	
Valină		Glicină
Leucină		Alanină
Izoleucină		Acid asparagic
Fenilalanină → Tirozină		Acid glutamic
Treonină		Serină
Metionină → Cisteină (cistină)		Arginină
Lizină		Prolină
Triptofan		Hidroxiprolină
Histidină		

Scanned with OKEN Scanner

Unii aminoacizi esenţiali pot fi înlocuiţi în hrană cu alţii. Tirozina se poate forma din fenilalanină, iar cisteina, din metionină. Arginina este sintetizată în cantitate suficientă în organismul matur, nu, însă, şi în organismul tânăr, în curs de creştere sau slăbit de boală. Capacitatea de sinteză pentru diferiţii aminoacizi variază cu specia animală.

8.5.2. DEGRADAREA OXIDATIVĂ A AMINOACIZILOR

Aminoacizii din constituţia proteinelor vertebratelor sunt degradaţi oxidativ prin secvenţe enzimatice specifice fiecărui aminoacid. Toate aceste secvenţe converg către câteva căi care duc la piruvat, acetil-CoA sau intermediari din ciclul acizilor tricarboxilici (fig. 8.11. şi 8.12.).

Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic are loc numai dacă este de faţă *coenzima acetilării*, numită *coenzima A*, codehidraza I şi hidroderivatul ei (DPN-DPNH), sistemul acizilor adenozin-difosforic şi –trifosforic (ADP şi ATP) şi fosfat anorganic.

Coenzima care conţine grupa SH, (CoA-SH), este coenzima unui mare număr de reacţii, la care participă grupa acetil. Un intermediar esenţial în decarboxilarea oxidativă este *acetilcoenzima A*, care conţine o grupă acetil legată de sulf ($CoA–S–OCCH_3$). Coenzima A se combină cu ionul acetat, în prezenţa acidului adenozin-trifosforic. Procesul decurge în două etape:

$$CoA–SH + ATP \rightarrow CoA–S–PO_3H_2 + ADP$$

$$CoA–S–PO_3H_2 + CH_3COOH \rightarrow CoA–S–OCCH_3 + H_3PO_4$$

Acetil-coenzima A se formează şi din acid piruvic, la decarboxilarea acestuia în ţesuturile animale. În acest caz, nu este nevoie de ATP, dar la reacţie, participă codehidraza I:

$$CH_3COCOOH + CoA–SH + DPN \rightarrow CoA–S–OCCH_3 + DPNH \quad (1)$$

Acetil-coenzima A pune în libertate acetat, folosind, totodată, energia înmagazinată în legătura ei, pentru a sintetiza acid adenozin-trifosfaric:

$$CoA–S–PO_3H_2 \leftrightarrow CH_3COOH + CoA–S–PO_3H_2 \quad (2)$$

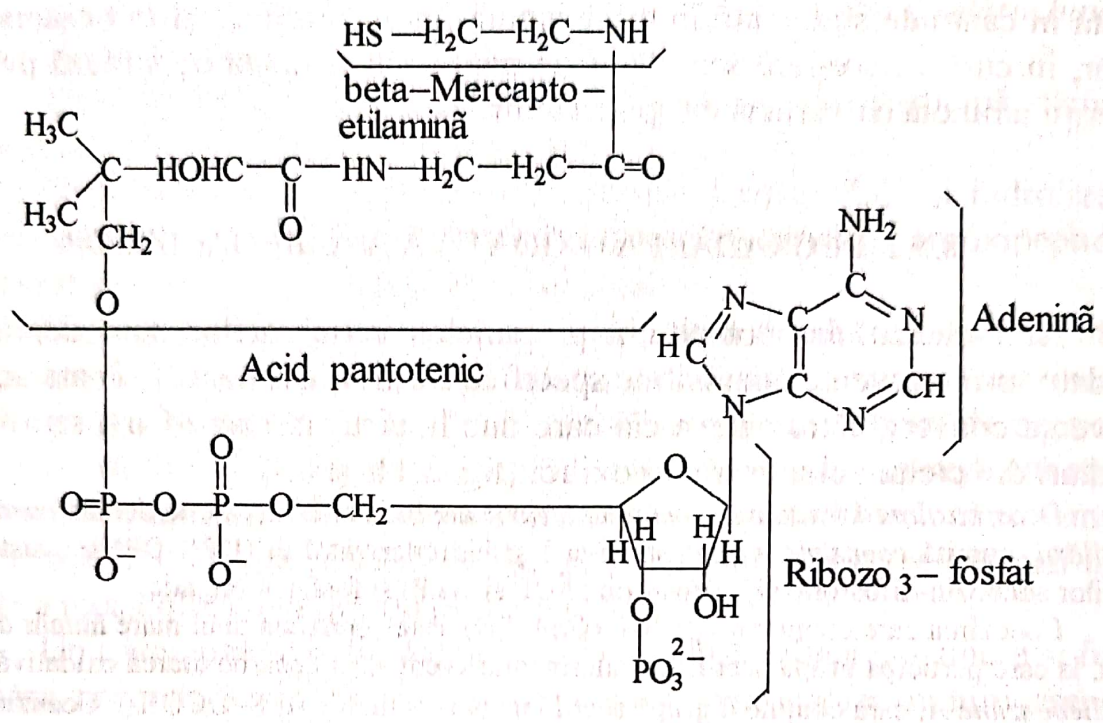
$$CoA–S–PO_3H_2 + ADP \leftrightarrow CoA–SH + ATP \quad (3)$$

Însumând ecuaţiile 1, 2 şi 3, se obţine ecuaţia globală (4):

$$CH_3COCOOH + DPN + H_3PO_4 + ADP \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + DPNH + ATP \quad (4)$$

Scanned with OKEN Scanner

Coenzima A este o combinaţie cu masă moleculară mică, care se găseşte în ţesuturi şi are în structura sa chimică acid pantotenic:



Coenzima A

Funcţia coenzimei A este de a transporta grupările acil la oxidarea enzimatică a piruvatului, la oxidarea enzimatică a acizilor graşi, la acetilările biologice, la sinteza acizilor graşi. Coenzima A se scrie obişnuit „CoA" sau „CoA-SH", pentru a se evidenţia gruparea tiol.

Acetil-coenzima A (acetil-CoA) se formează la oxidarea enzimatică a piruvatului sau a acizilor graşi; ea poate apărea şi ca urmare a acţiunii acetil-CoA sintetazei asupra acetatului liber (1):

$$ATP + \text{coenzima A} + \text{acetat} \leftrightarrow AMP + \text{Acetil-CoA} + \text{pirofosfat}$$

Acetil-CoA astfel formată poate să reacţioneze enzimatic cu un acceptor de grupări acil.

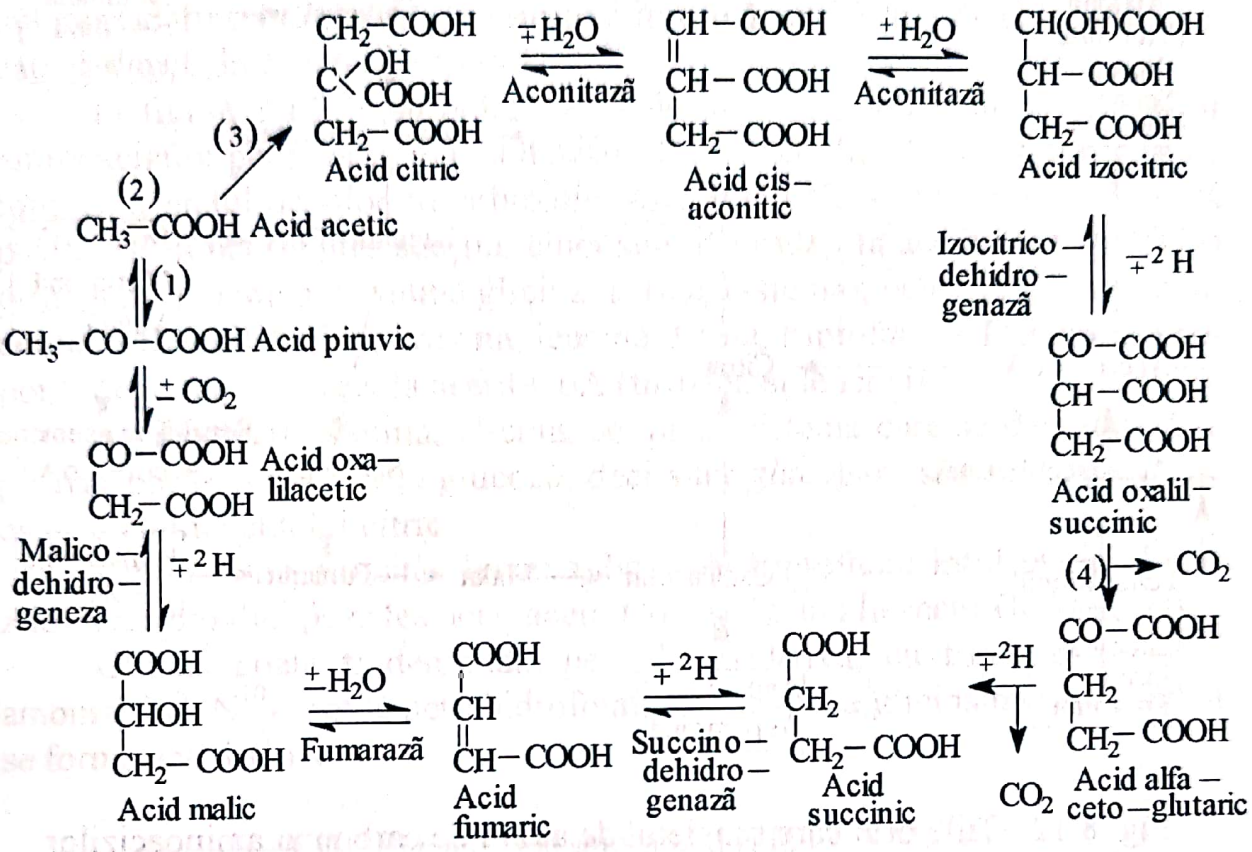
O a doua reacţie esenţială a acidului piruvic în ţesuturile vii (în ficatul mamiferelor şi în bacterii) este reacţia de carboxilare, care duce la acidul oxalilacetic:

$$\underset{\text{Acid piruvic}}{HOOC–CO–CH_3} + CO_2 \rightarrow \underset{\text{Acid oxalilacetic}}{HOOC–CO–CH_2–COOH}$$

Între acidul oxalilacetic şi acetil-coenzima A, are loc o reacţie de condensare, la care participă grupa CH_3 a acetilului şi în care se formează acid citric. Această succesiune de degradări este cunoscută sub numele de *ciclul acizilor tricarboxilici* (Krebs).

Acizii citric, α–cetoglutaric, fumaric şi malic sunt componente normale ale tuturor celulelor vii.

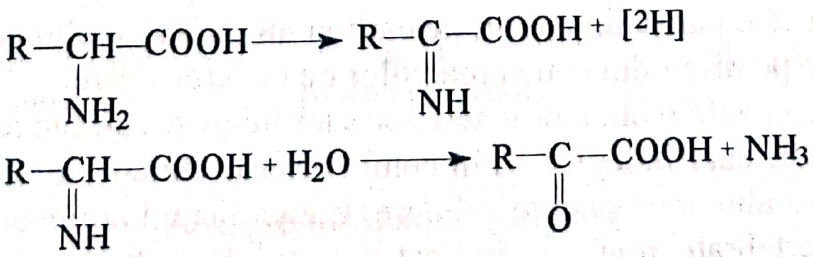
Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor, în toate celulele vii decurge după ciclul lui Krebs a acizilor tricarboxilici (fig. 8.11.).



1. Reacţie catalizată de sistemul enzimatic al decarboxilării oxidative. 2. Sub formă de acetil-coenzimă A. 3. Reacţie catalizată de „enzima de condensare". 4. Reacţie catalizată de decarboxilaza oxalo-succinică, în prezenţă de ioni Mn^{2+}

Fig. 8.11. Ciclul acizilor tricarboxilici al lui Krebs şi relaţiile cu metabolismul glucidelor, grăsimilor şi proteinelor

Eliminarea azotului din aminoacizi, sub formă de amoniac, este o reacţie oxidativă ducând la acizi α–cetonici. Procesul decurge în două faze, din care prima este enzimatică şi duce la aminoacizi, care reacţionează repede cu apa şi eliberează amoniac:



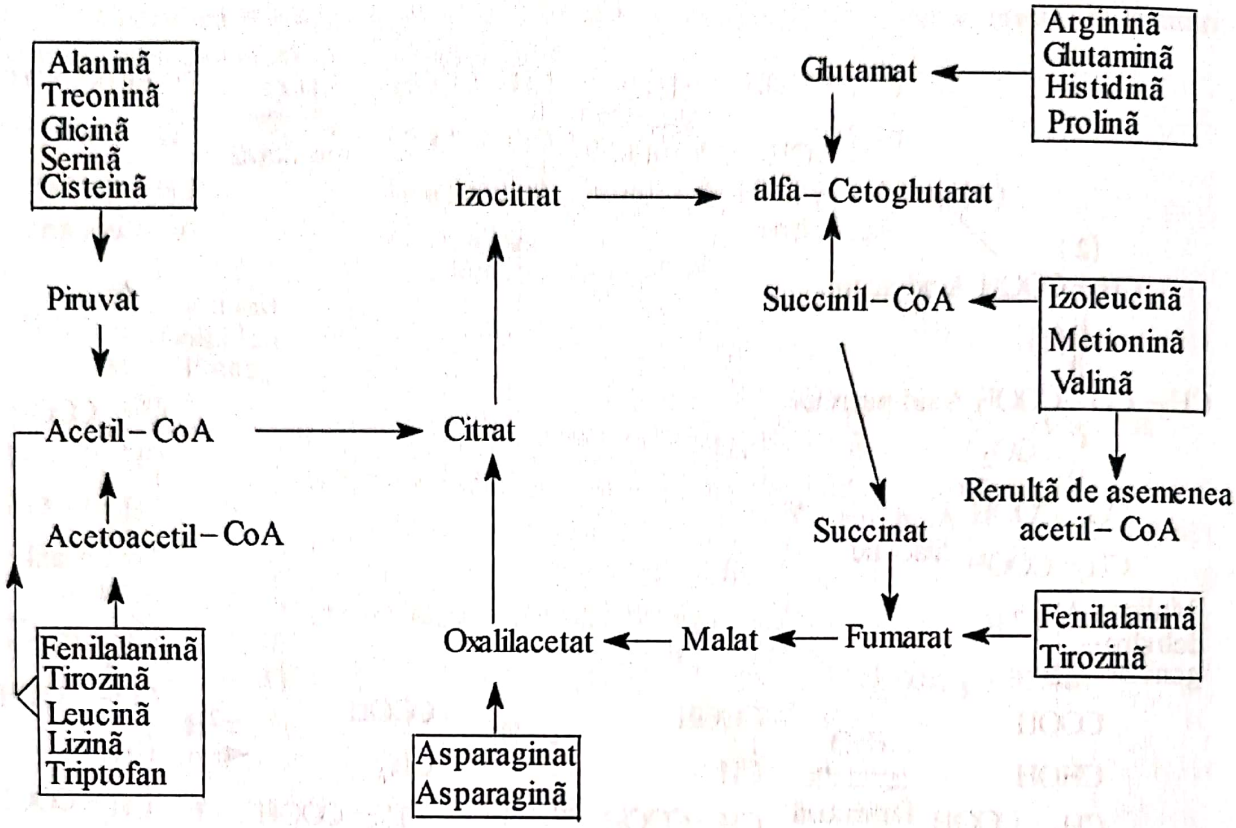


Fig. 8.12. Căile prin care scheletul de atomi de carbon ai aminoacizilor intră în ciclul acizilor tricarboxilici

Schema oxidării aminoacizilor. Aşa după cum s-a arătat, aminoacizii din alcătuirea proteinelor sunt degradaţi oxidativ prin secvenţe enzimatice diferite pentru fiecare aminoacid. Toate aceste secvenţe converg până la sfârşit către câteva căi care duc la piruvat, acetil-CoA sau intermediari din ciclul acizilor tricarboxilici al lui Krebs. Conform figurilor 8.11. şi 8.12., 11 aminoacizi sunt convertiţi în final la acetil-CoA fie direct, fie pe calea piruvatului sau a acetoacetil-CoA, cinci sunt convertiţi la α–cetoglutarat, trei la succinil-CoA şi doi la oxalilacetat. Doi aminoacizi, fenilalanina şi tirozina, sunt astfel degradaţi, încât o parte a scheletului lor de carbon intră în ciclul acizilor tricarboxilici, ca acetil-CoA, iar cealaltă parte, ca fumarat (1). Se menţionează că o parte din atomii de carbon nu intră în ciclul acidului oxalic, fiind pierduţi pe drum din cauza reacţiilor de decarboxilare.

Căile catabolice ale aminoacizilor sunt lungi şi complexe, apar o serie de intermediari care îndeplinesc în celulă diferite funcţii, în special, de precursori pentru alte componente celulare. Catabolismul aminoacizilor se desfăşoară, la vertebrate, mai ales, în ficat şi destul de mult în rinichi.

Scanned with OKEN Scanner

Atomii de azot din grupa α–amino, îndepărtaţi din aminoacizi în cursul degradării oxidative, sunt eliminaţi în urină, sub formă de uree, amoniac sau acid uric, în funcţie de specie.

În figura 8.12., s-au arătat punctele prin care scheletul de carbon al aminoacizilor poate intra în ciclul acizilor tricarboxilici. Punctul principal de intrare în ciclul acizilor tricarboxilici este acetil-CoA; 11 aminoacizi intră prin acest punct. Dintre aceştia, cinci sunt degradaţi la acetil-CoA, pe calea piruvatului (alanina, treonina glicina, serina, cisteina), cinci pe calea acetoacetil-CoA (fenilalanina, tirozina, leucina, lizina, triptofanul). Doi aminoacizi pot fi degradaţi şi direct la acetil-CoA (tirozina şi leucina).

Aminoacizii, alanina, glicina, serina şi cisteina care se degradează la piruvat pot fi convertiţi la glucoză, deci sunt *glucogeni* sau sunt oxidaţi pe calea ciclului acidului citric.

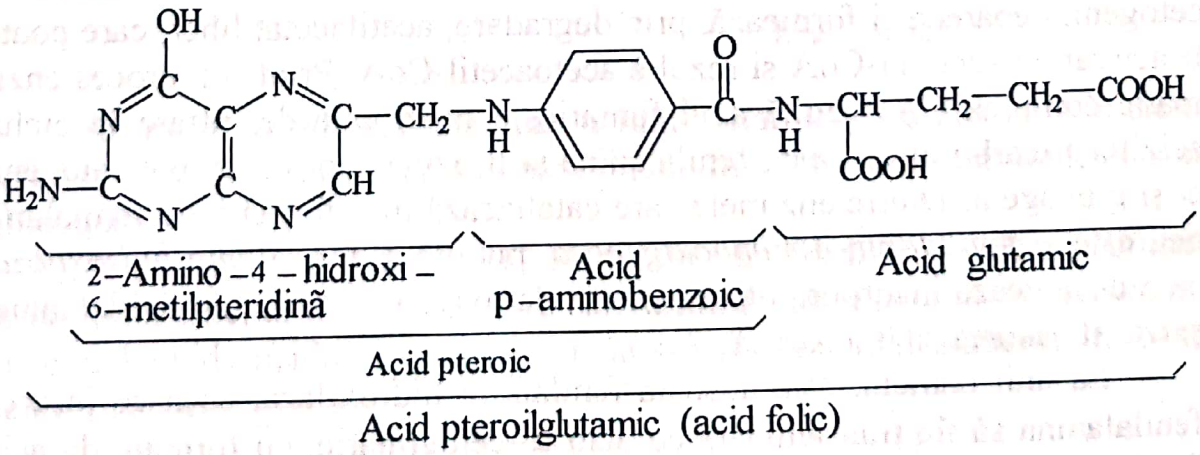
Fenilalanina, tirozina, leucina, lizina şi triptofanul intră în ciclul acizilor tricarboxilici pe calea acetoacetil CoA şi de aici la acetil CoA.

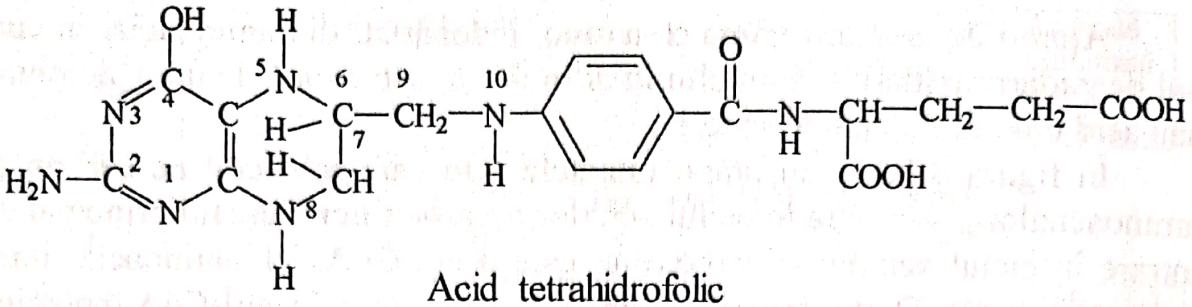
Glicina poate fi degradată pe cale oxidativă, cu formare de CO_2, amoniac N^5, N^{10}- metilentetrahidrofolat, sub acţiunea glicinsintetazei, fără a se forma acetil-CoA:

$$H_2–CH_2–COOH + \text{tetrahidrofolat } (FH_4) + NAD^+ \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow N^5, N^{10}\text{- metilen} – FH_4 + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

Notă. FH_4 = tetrahidrofolat. Acidul folic este foarte răspândit în plante. Prezenţa sa insuficientă la animale duce la încetinirea creşterii şi la anemie. Acidul folic este format dintr-o pteridă substituită, acid p-aminobenzoic şi acid glutamic (vezi fig. 8.13. care cuprinde structura acidului folic şi tetrahidrofolic)





Acid tetrahidrofolic

Fig. 8.13. Acidul folic şi acidul tetrahidrofolic

Studii enzimatice şi metabolice au arătat că, sub formă de coenzimă, acidul folic funcţionează în transferul unor grupări cu un atom de carbon. Acidul folic este precursorul acidului tetrahidrofolic, coenzimă, care rezultă prin reducerea acidului folic. Tetrahidrofolatul, notat cu FH_4, este un transportor intermediar al grupărilor hidroximetil ($-CH_2OH$), formil (-CHO) sau metil ($-CH_3$), într-un mare număr de reacţii enzimatice (1).

Fenilalanina, tirozina, leucina, lizina şi triptofanul se degradează pe calea acetoacetil-CoA şi de aici la acetil-CoA. Fenilalanina şi tirozina sunt cetogeni, deoarece ei formează prin degradare acetilacetat liber.

O cale de degradare a glicinei este transformarea ei în serină de către *serin hidroximetiltransferaza*, o enzimă cu piridoxal-fosfat; serina este apoi deshidratată şi dezaminată la piruvat de către serin dehidratază, care conţine, de asemenea, piridoxal-fosfat (1).

Cisteina poate fi degradată pe mai multe căi, dintre care se menţionează conversia ei la piruvat:

Cisteină + apă $\leftrightarrow$ piruvat + NH_3 + H_2S

reacţie catalizată de *cistationin–γ–liază.*

Fenilalanina, tirozina, leucina, lizina şi triptofanul se degradează pe calea acetoacetil-CoA şi, de aici, la acetil-CoA. Fenilalanina şi tirozina sunt cetogeni, deoarece ei formează, prin degradare, acetilacetat liber, care poate fi activat cu succinil-CoA şi rezultă acetoacetil-CoA. Printr-un proces enzimatic complex (1), rezultă acid fumaric, o nouă cale de intrare în ciclul acizilor tricarboxilici. Deci, fenilalanina şi tirozina sunt nu numai cetogeni, ci şi glucogeni. Dintre enzimele care catalizează transformări ale fenilalaninei, este şi *fenilalanin-4-monooxigenaza*, numită şi *fenilalanin hidroxilaza*, care catalizează încorporarea unui atom de oxigen în molecula fenilalaninei şi transformarea sa în tirozină.

La unii oameni, este absentă fenilanilin hidroxilaza, ceea ce face ca fenilalanina să fie transaminată cu acid α–cetoglutaric, cu formare de acid fenil-piruvic, care se acumulează în sânge şi se elimină prin urină. La copii, fenilpiruvatul aflat în exces în sânge afectează dezvoltarea normală a creierului,

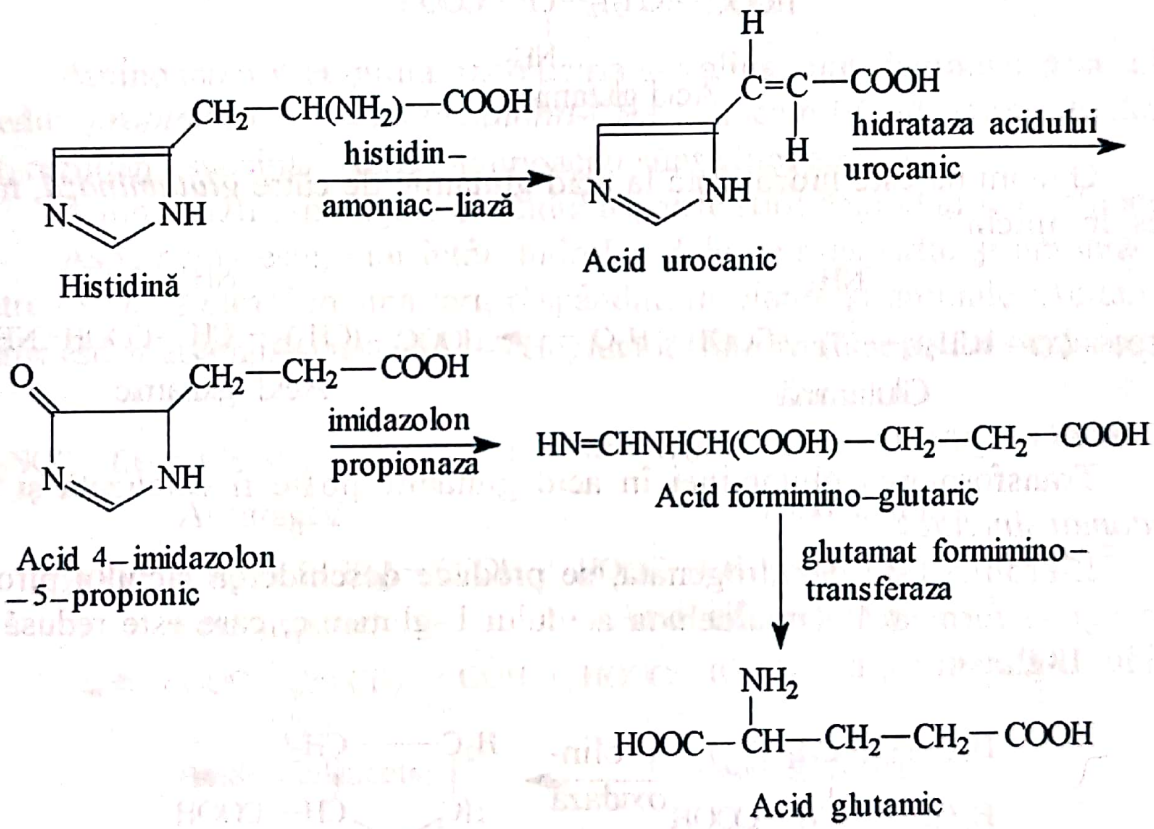
Scanned with OKEN Scanner

provocând grave înapoieri mintale. Alimentarea unor astfel de copii cu regimuri lipsite de fenilalanină previne înapoierea mintală.

Aminoacizii fenilalanina şi tirozina pot fi convertiţi şi la fumarat şi apoi la acetato-acetil-Coa şi acetil-CoA.

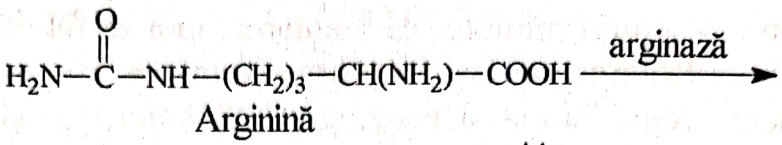
Leucina poate fi convertită şi direct la acetil-CoA, ca şi izoleucina, treonina şi triptofanul.

Histidina se oxidează la acid glutamic, prin deschiderea ciclului imidazolic, cu formarea acidului N-formiminoglutamic, un intermediar care conţine grupa formimino (HN=CH–) ce este îndepărtată de o enzimă care foloseşte ca acceptor al grupării cu un atom de carbon a tetrahidrofolatului (FH_4):

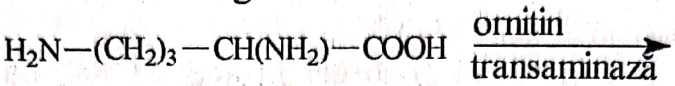


Arginina, histidina, glutamina, acidul glutamic şi prolina intră în ciclul acizilor tricarboxilici pe calea cetoglutaratului; toţi aceşti aminoacizi sunt glucogeni.

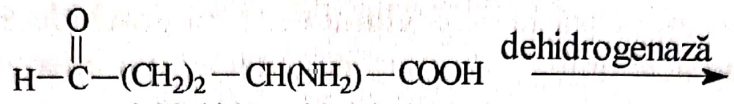
Arginina, în ficatul mamiferelor, este transformată de către *arginază* în ornitină, care, la rândul său, este convertită de către *ornitin-transaminază* la semialdehida acidului glutamic şi, în sfârşit, la acidul glutamic de către *dehidrogenază:*



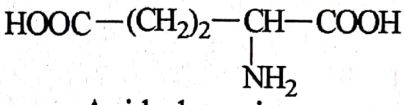
Arginină



Ornitină

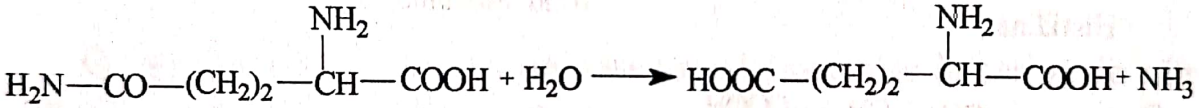


gama semialdehida acidului glutamic



Acid glutamic

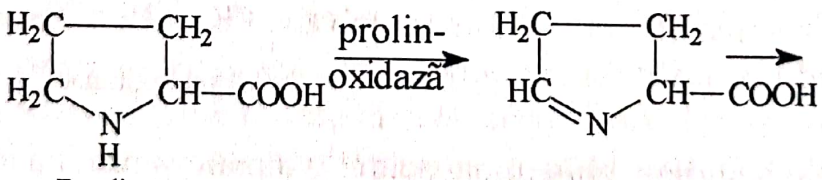
Glutamina este hidrolizată la acid glutamic de către *glutaminază*, mai ales, în rinichi:



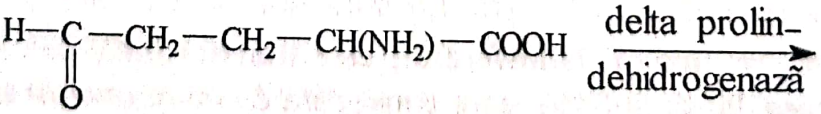
Glutamină Acid glutamic

Transformarea glutaminei în acid glutamic poate fi catalizată şi de *glutamat sintetaza*.

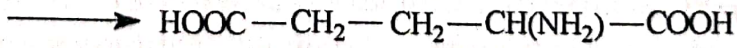
L-Prolina este dehidrogenată, se produce deschiderea ciclului pirolidinic şi se formează semialdehida acidului L-glutamic, care este redusă la acidul L-glutamic:



Prolină Acid delta-prolin-5-carboxil

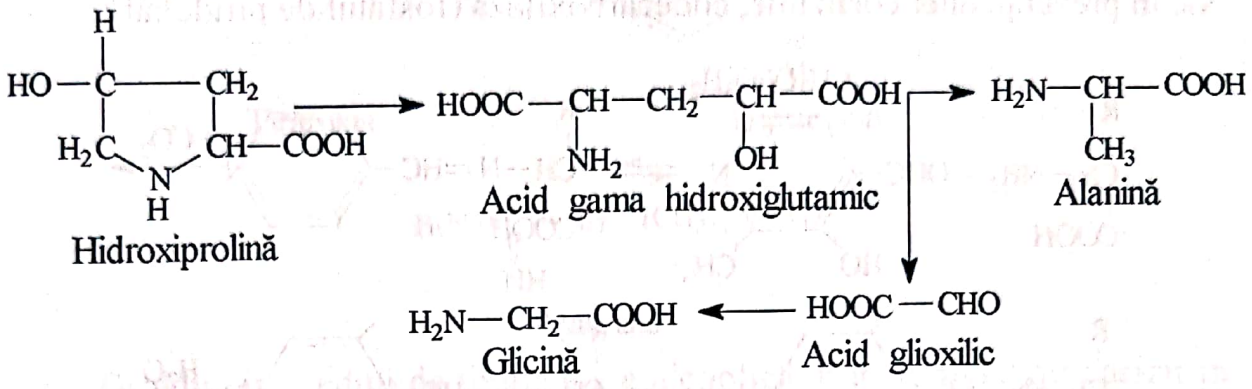


gama semialdehida acidului glutamic



Acid glutamic

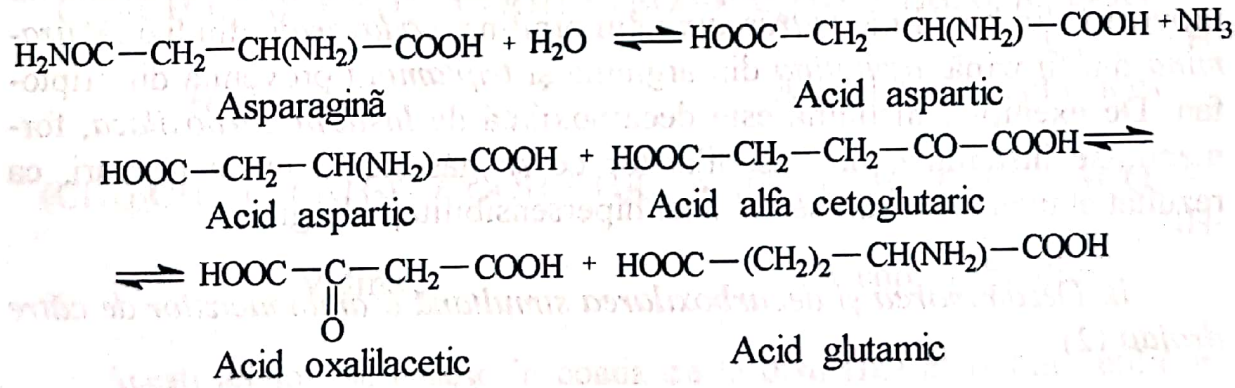
Hidroxiprolina este transformată în acid γ–hidroxiglutamic şi acesta, în alanină şi glicină:



Aminoacizii metionina, izoleucina şi valina sunt degradaţi prin intermediul *propionil-CoA* şi *metilmalonil-CoA* la succinil-CoA, care este deacilat, rezultând succinat. Aceşti aminoacizi sunt glucogeni (1).

Aminoacizii asparagina şi acidul aspartic sunt degradaţi la oxalilacetat.

Asparagina este, mai întâi, hidrolizată la acid aspartic şi amoniac de către *asparaginază*, enzimă larg răspândită în plante şi animale. Acidul aspartic este transaminat cu acidul α–cetoglutaric, formându-se acidul oxalilacetic:

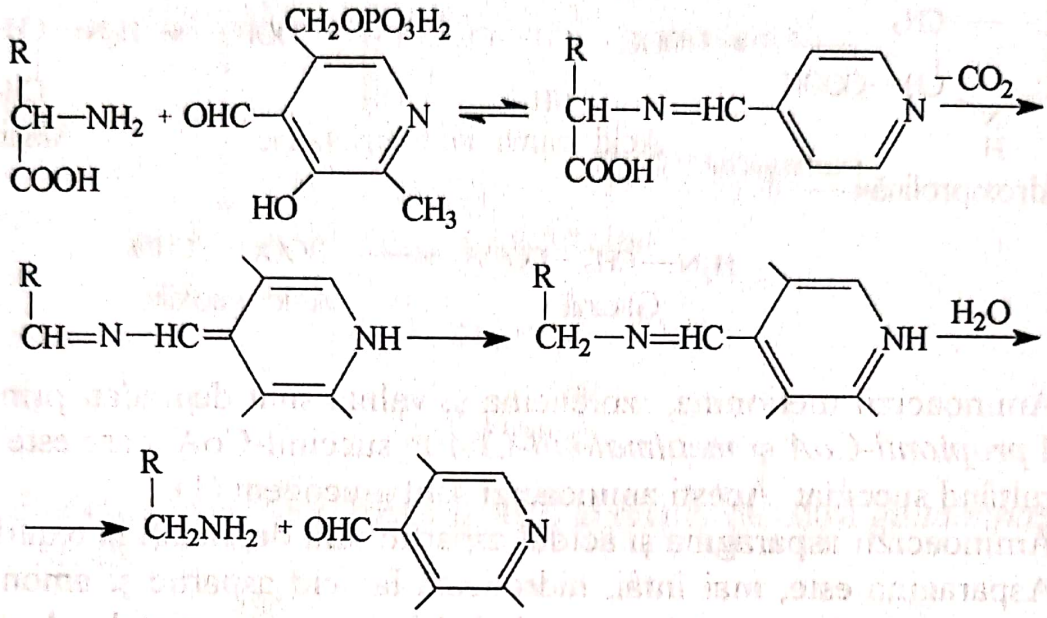


8.5.3. DECARBOXILAREA AMINOACIZILOR DE CĂTRE MICROORGANISME

A. Decarboxilarea. Bacterium Coli şi *Bacterium subtilis* transformă aminoacizii în aminele primare corespunzătoare (1, 2):

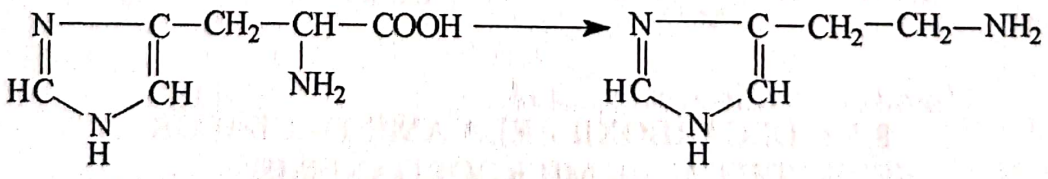
$$R–CHNH_2–COOH \rightarrow R–CH_2NH_2 + CO_2$$

Enzimele care determină aceste reacţii sunt *aminoacid–decarboxilazele*, specifice pentru fiecare aminoacid. Multe dintre aceste reacţii enzimatice au loc în prezenţa unei coenzime, codecarboxilaza (fosfatul de piridoxal):

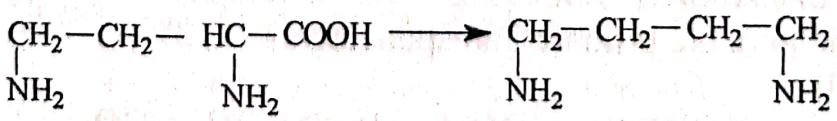


Dintre aminele primare care iau naştere în reacţiile de decarboxilare ale α–aminoacizilor, numite şi *amine biogene*, se menţionează *histamina* provenită din histidină, *putresceina* din ornitină, *cadaverina* din lizină, *tiramina* din tirozină, *agmatina* din arginină şi *triptamina* provenită din triptofan. De exemplu, histidina este decarboxilată de *histidin carboxilaza*, formându-se histamină, un vasodilatator ce se găseşte în unele ţesuturi, ca rezultat al unei inflamări sau al unei hipersensibilităţi alergice:

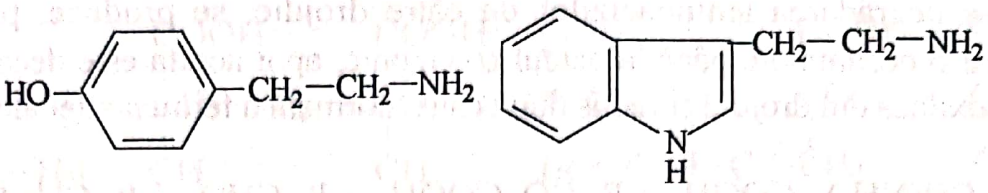
B. Dezaminarea şi decarboxilarea simultană a aminoacizilor de către drojdii (2).



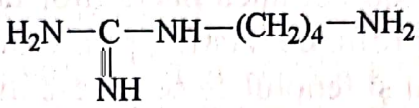
Histidină Histamină



Ornitină Putresceină

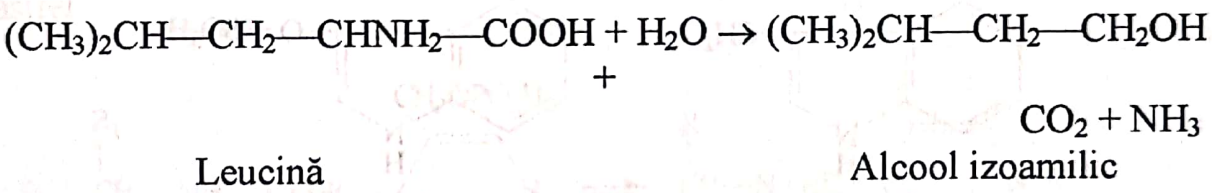


Tiramina Triptamina

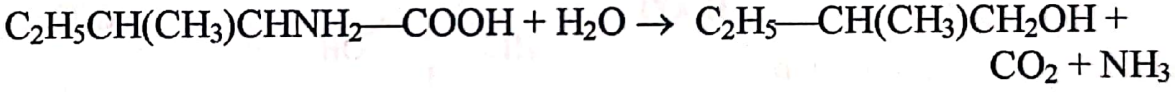


Agamina

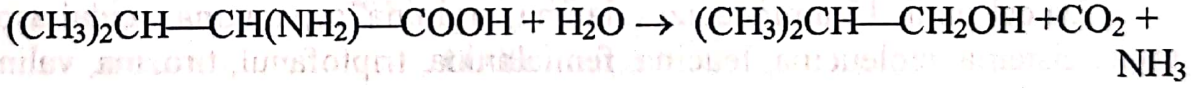
Drojdia, în mediul de fermentație alcoolică, transformă aminoacizii în alcooli primari. Din leucină, se formează alcoolul izoamilic, din izoleucină, alcoolul amilic optic activ, iar din valină, alcoolul izobutilic:



Leucină Alcool izoamilic



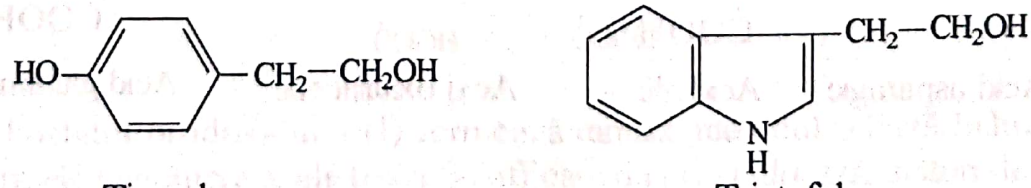
Izoleucină Alcool amilic optic activ



Valina Alcool izobutilic

Aceşti alcooli se găsesc în coada de la distilarea alcoolului etilic industrial şi provin din proteinele care se găsesc în materia primă supusă fermentației.

Drojdia de bere acționează asupra tuturor α–aminoacizilor. Astfel, de exemplu, din tirozină se formează alcool p-hidroxifenil-etilic (tirosolul), iar din triptofan, rezultă alcoolul β–indoliletilic (triptofolul):



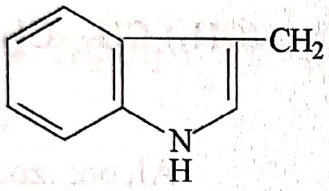
Tirosol Triptofol

Scanned with OKEN Scanner

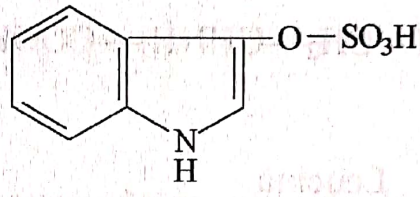
La degradarea aminoacizilor de către drojdie, se produce, probabil, mai întâi o dezaminare până la acidul α–cetonic, apoi acesta este decarboxilat de carboxilaza din drojdie şi redus după calea normală a fermentaţiei alcoolice:

$$R–CH(NH_2)–COOH \rightarrow R–CO–COOH \rightarrow R–CHO \rightarrow R–CH_2–OH$$

În intestinul gros, sub acţiunea bacteriilor de putrefacţie, aminoacizii suferă transformări mai profunde. Astfel, prin oxidarea catenei laterale a tirozinei, rezultă p-crezolul şi fenolul ce se găsesc în excremente. Triptofanul, pe aceeaşi cale se transformă în scatol (β–metilindolul) şi indol, substanţe ce determină mirosul fecalelor. Triptofanul prin oxidare pe cale biochimică se transformă în indoxil, care, în parte, se elimină prin urină sub formă de acid fenil-sulfuric:



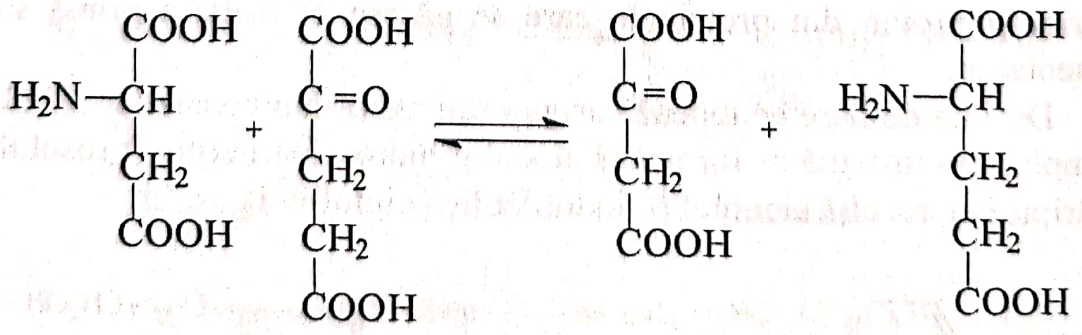
Scatol



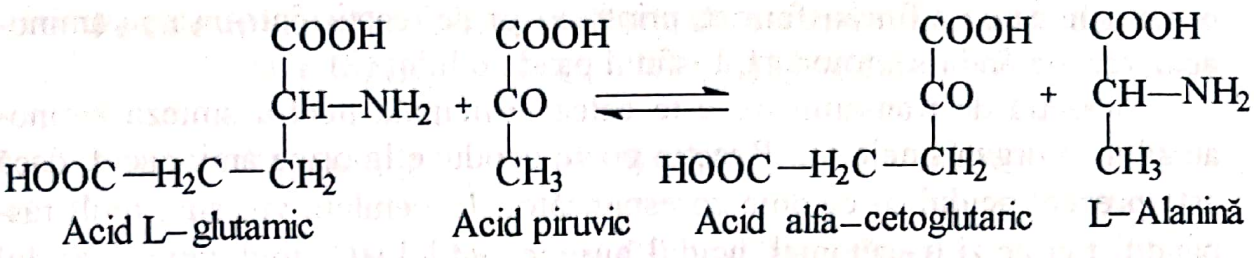
Acid indoxil sulfuric

8.5.4. TRANSAMINAREA AMINOACIZILOR

La cel puţin 12 aminoacizi (alanina, arginina, asparagina, acidul asparagic, cisteina, izoleucina, leucina, fenilalanina, triptofanul, tirozina, valina) gruparea α–aminică poate fi tranferată enzimatic la atomul de carbon α al unui α–ceto-acid, care, de obicei, este acidul α–cetoglutaric sau piruvic:

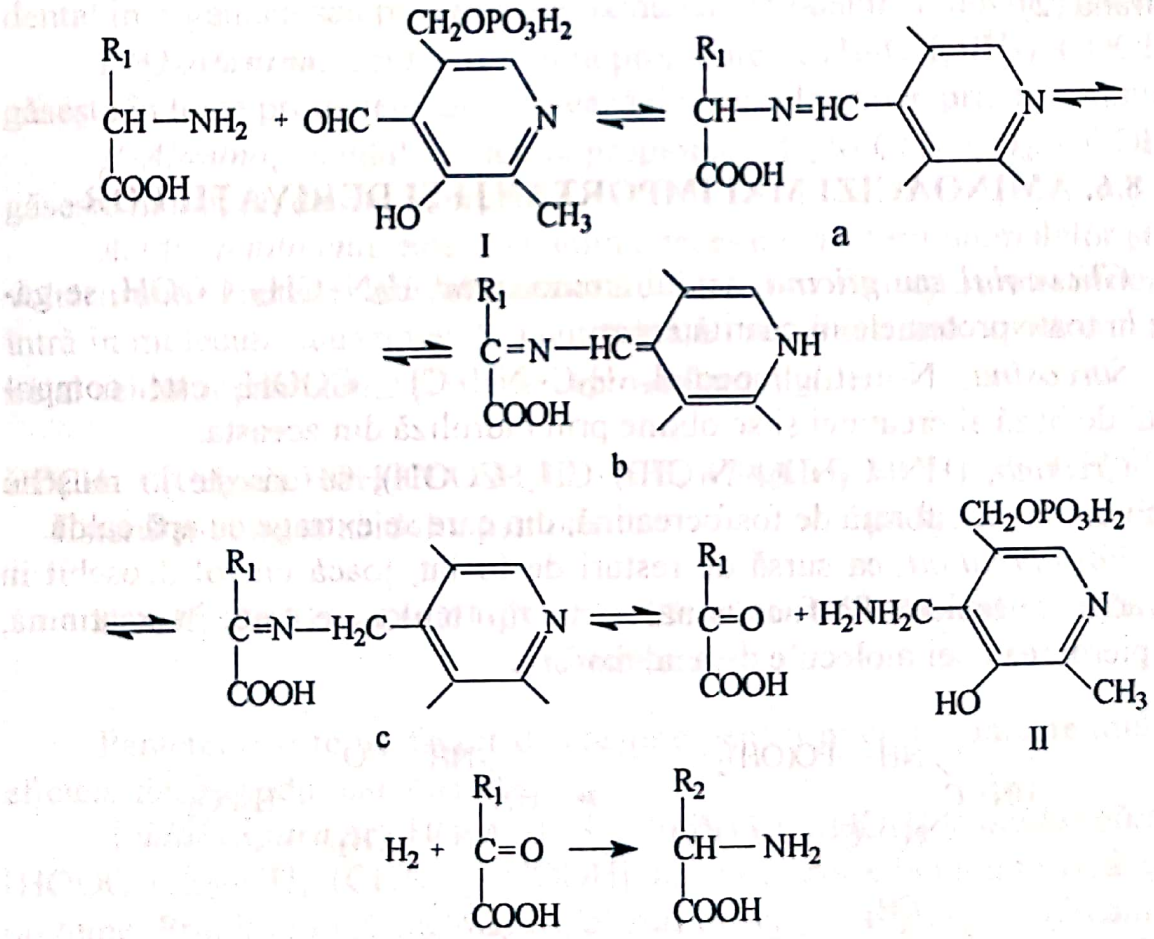


Acid asparagic — Acid alfa–cetoglutaric — Acid oxalilacetic — Acid glutamic



Enzimele care catalizează transferul unei grupe amino de la un aminoacid la un α–ceto-acid pentru a forma un nou aminoacid se numesc *transaminaze*. Transaminazele sunt mult răspândite în țesuturile animale și vegetale și în microorganisme. Reacția de transaminare necesită și participarea unei coenzime, *cotransaminaza*, reprezentată prin sistemul piridoxal-piridoxamină, sub formă de fosfați.

Transformările care au loc în reacțiile de desaminare pot fi formulate astfel:



Fosfatul piridoxalului (I) formează cu aminoacidul o bază Schiff; una din formele tautomere a, ale bazei Schiff care dă prin hidroliză, alături de acidul cetonic, fosfatul piridoxaminei (II). Acesta reacționează cu un alt acid

α–cetonic care va fi transformat, printr-un şir de reacţii, într-un nou aminoacid, regenerându-se, totodată, fosfatul piridoxalului (2).

Reacţia de transaminare este calea principală pentru sinteza aminoacizilor în organismele vii. Reacţia poate conduce la orice aminoacid, dacă este prezent acidul α–cetonic corespunzător. În celulele vii, sunt mult răspândiţi trei acizi α–cetonici: acidul piruvic, acidul α–cetoglutaric şi acidul oxalil-acetic.

Acidul glutamic este unul din cei mai importanţi donori de grupe NH_2 în sinteza aminoacizilor, iar transaminazele, care catalizează reacţiile de transaminare de la acest aminoacid la diverşi acizi cetonici, sunt foarte răspândite.

Pe de altă parte, acidul α–cetoglutaric poate accepta grupe NH_2 de la aproape toţi α–aminoacizii naturali, pentru a trece în acid glutamic. Acidul glutamic se mai poate forma prin aminarea directă a acidului α–cetoglutaric, sub acţiunea dehidrogenazei L-glutamice. Amoniacul necesar provine din dezaminarea oxidativă a aminoacizilor din proteinele proprii sau proteinele din hrană (2).

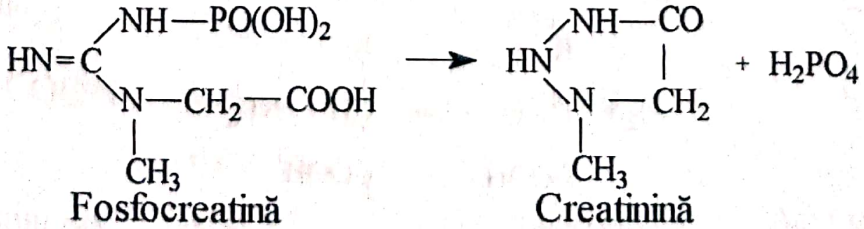
8.6. AMINOACIZI MAI IMPORTANŢI ŞI DERIVAŢII LOR

Glicocolul sau ***glicina***, acidul aminoacetic, $H_2N–CH_2–COOH$, se găseşte în toate proteinele în cantităţi mari.

Sarcosina, N-metilglicocolul, $H_3C–NH–CH_2–COOH$, este componentul de bază al creatinei şi se obţine prin hidroliză din aceasta.

Creatina, $(HN=C(NH_2)–N(CH_3)–CH_2–COOH)$, se găseşte în muşchii vertebratelor, sub formă de fosfocreatină, din care se extrage cu apă caldă.

Fosfocreatina, ca sursă de resturi de fosfat, joacă un rol deosebit în contracţia musculară. Fosfocreatina, în condiţii biologice, trece în creatinină, prin pierderea unei molecule de acid fosforic:



Fosfocreatină Creatinină

Pe cale de sinteză, creatina se obţine din sarcosină şi cianamidă:

$$N{\equiv}C{-}NH_2 + H_3C{-}NH{-}CH_2{-}COO \rightarrow$$

Cianamidă Sarcosină

$$\rightarrow HN{=}C(NH_2){-}N(CH_3){-}CH_2{-}COOH$$

Creatină

Derivaţi N-acilaţi ai glicocolului se găsesc în natură. Unul dintre aceştia este acidul glicocolic (R–CO–NH–CH_2–COOH), care este compusul N-acilat al glicocolului cu cel mai important dintre acizii biliari, acidul colic.

Benzoilglicocolul (acidul hipuric), C_6H_5–CO–NH–CH_2–COOH se găseşte în urina mamiferelor, ca urmare a proceselor de detoxicare a acizilor aromatici. Prin transformare în acid hipuric a acidului benzoic introdus accidental în organism sau provenit din oxidarea fenilalaninei, devine inofensiv.

L(+)-Alanina, acidul α–aminopropionic, CH_3–$CH(NH_2)$–COOH, se găseşte în toate proteinele. Se formează din acidul piruvic prin transaminare.

β–Alanina, acidul β–aminopropionic, H_2N–CH_2–CH_2–COOH se găseşte în natură, dar nu în proteine.

Acidul pantotenic este o vitamină necesară creşterii animalelor şi dezvoltării unor bacterii. Acidul pantotenic intră în constituţia panteteinei care intră în molecula coenzimei A. Panteteina a fost sintetizată din esterul metilic al acidului pantotenic şi β–mercapto-etilamină (2):

$$HOCH_2{-}C(CH_3)_2{-}CHOH{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}CH_2{-}COOCH_3 + H_2N{-}CH_2{-}CH_2SH \rightarrow$$

Esterul metilic al acidului pantotenic β–Mercapto–etilamină

$$HOCH_2{-}C(CH_3)_2{-}CHOH{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}CH_2{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}CH_2SH$$

Panteteină

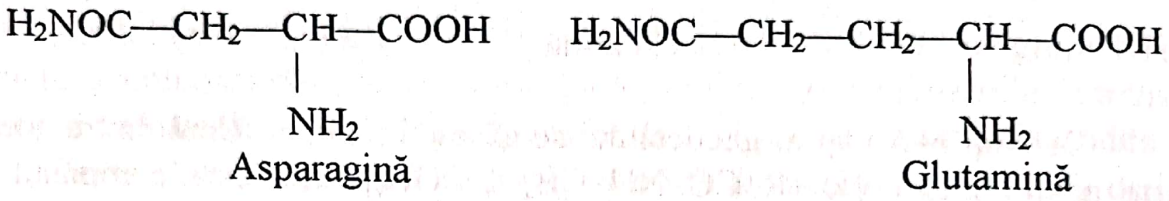
Panteteina este un factor de creştere pentru microorganisme mult mai eficient decât acidul pantotenic.

Acidul asparagic [HOOC–CH_2–$CH(NH_2)$–COOH] şi ***acidul glutamic*** [HOOC–CH_2–CH_2–$(CHNH_2)$–COOH], acizi dicarboxilici mult răspândiţi în proteine. Prin hidroliză enzimatică, alături de acizii asparagic şi glutamic, se obţin şi monoamidele lor, *asparagina* şi *glutamina*, în care sunt amidificate grupele aminice din resturile laterale.

Scanned with OKEN Scanner

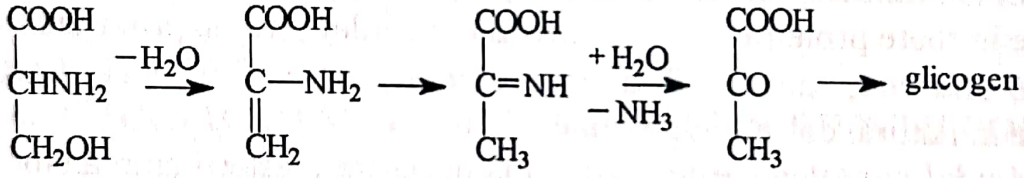
Asparagina şi ***glutamina*** au un rol important, ca rezervă de amoniac, la sinteza aminoacizilor în organism.

Glutamina a fost identificată în cantităţi mari în ţesuturi şi în sânge. Ea este sintetizată în ţesuturi, atunci când acestea conţin amoniac în exces şi este hidrolizată pentru a pune în libertate amoniacul necesar sintezei aminoacizilor. Ambii aminoacizi se găsesc în stare liberă şi în plante.



Asparagină Glutamină

Serina, acidulβ–hidroxiα–aminopropionic,[OH–CH2–CH(NH_2)–COOH], se găseşte în toate proteinele şi a fost izolată prima dată din mătase. Serina este dezaminată, în ficat, de desaminaza serinei, care acţionează, probabil, în felul următor, observându-se că numai prima fază este enzimatică (2):

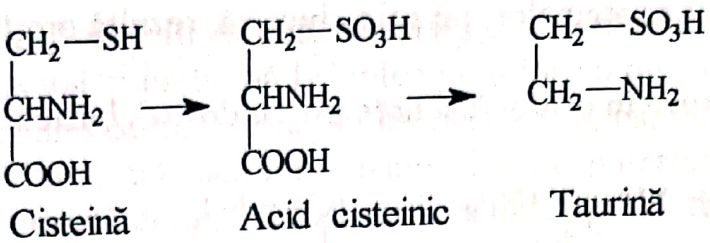


Tirozina, acidul β–(p–hidroxifenil)–α–aminopropionic, [HO–C_6H_4–CH_2 –CH(NH_2) –COOH], se găseşte în toate proteinele. În alimentaţie, tirozina poate fi înlocuită de fenilalanină care, în organismul animal, se transformă ireversibil în tirozină. În organismul animal, tirozina este precursorul hormonilor adrenalina şi tiroxina, a unor alcaloizi şi a altor compuşi aromatici. Tirozina catalizează formarea melaninei, pigmentul negru-brun din piele şi păr. Absenţa tirozinei împiedică formarea melaninei care duce la albinism.

Cisteina şi cistina. Cistina, acidul di–α–amino–β–tiopropionic, [HOOC– CH(NH_2)–CH_2–S–S–CH_2–CH(NH_2)–COOH], se găseşte în unele proteine. Cisteina, acidul α–amino–β–tiopropionic, [HS–CH_2–CH(NH_2)–COOH], ia naştere la hidroliza unor proteine şi se transformă uşor prin oxidare în cistină, care este greu solubilă şi, deci, uşor izolabilă. Cistina trece în cisteină, prin reducere.

Taurina, acidul amino-etansulfonic,[HO_3S–CH_2–CH_2–NH_2], se formează în organism din cisteină, prin oxidare şi decarboxilare:

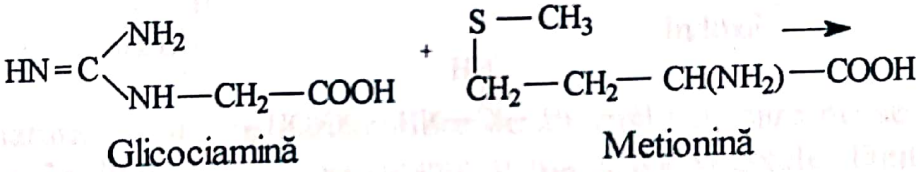
Scanned with OKEN Scanner



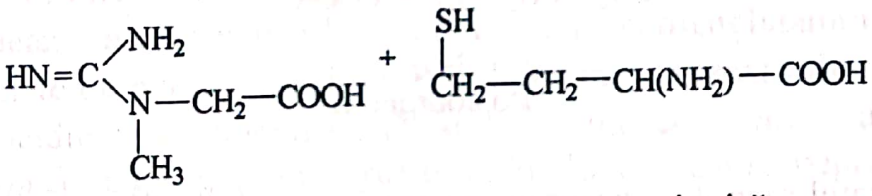
Cisteină Acid cisteinic Taurină

Taurina se găseşte în muşchii vertebratelor şi în fiere legată amidic de acidul colic ca acid taurocolic.

Metionina, acidul γ–metiltio–α–aminobutiric, [$H_3C - S - CH_2 - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$], se găseşte în cele mai multe proteine. În organism, îndeplineşte funcţia de transmetilare, cedând grupa metil şi transformându-se în homocisteină. Astfel, are loc procesul biologic de formare a creatinei din acidul guanidino-acetic (glicociamină) (2). Homocisteina se remetilează cu grupe metil cedate de colina sau de betaina din hrană, regenerând metionina:

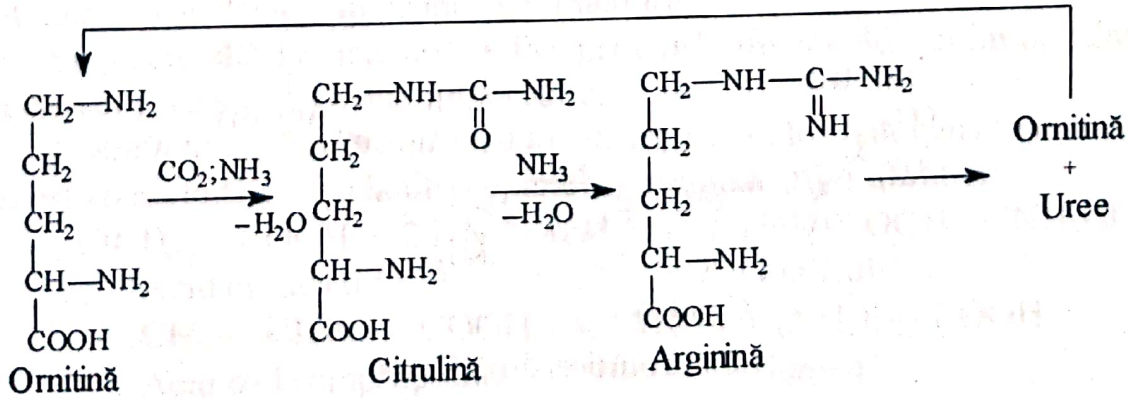


Glicociamină Metionină



Creatină Homocisteină

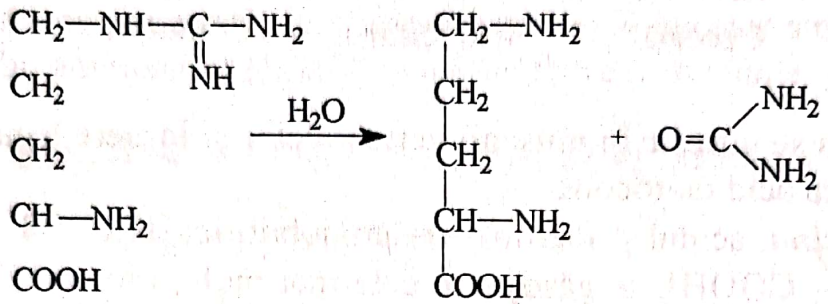
Ornitina, acidul α, δ–diaminovalerianic, [HOOC–$CH(NH_2)$–CH_2–CH_2–CH_2 –NH_2], nu este o componentă a proteinelor în care se găseşte sub formă de ***arginină***, acid δ–guanidino–α–aminovalerianic, [HOOC–$CH(NH_2)$–CH_2–CH_2–CH_2–NH–C(NH)–NH_2].



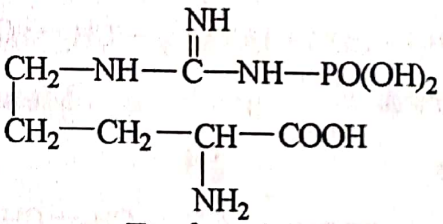
Ornitină Citrulină Arginină

La hidroliza proteinelor, pe cale chimică, rezultă ornitină care provine din arginină (2).

Arginina trece în ornitină şi uree prin hidroliză bazică:

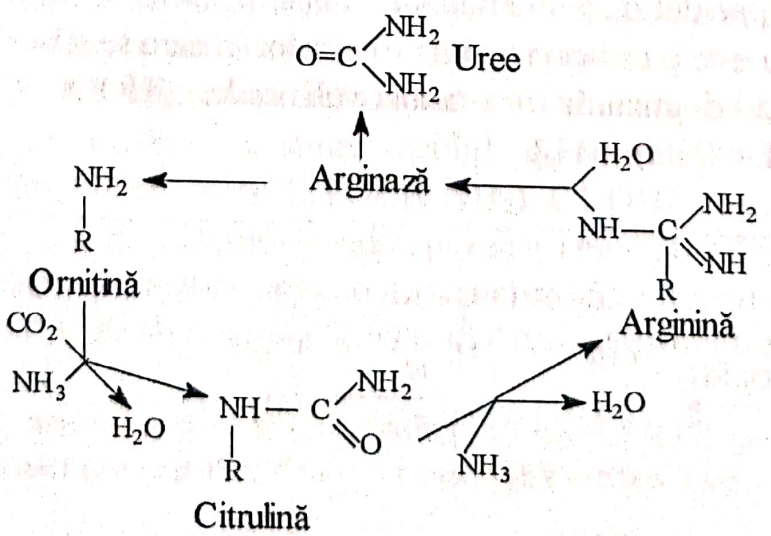


Muşchii nevertebratelor conţin *fosfoarginina* (acid arginin-fosforic) care este analog fosfocreatinei şi îndeplineşte aceeaşi funcţie ca fosfocreatina în muşchii vertebratelor.



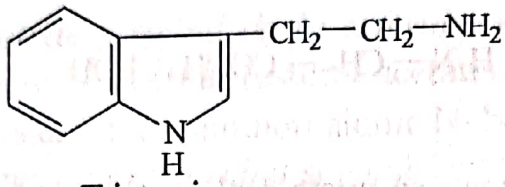
Fosfoarginina

În ficatul mamiferelor, arginaza catalizează hidroliza argininei în uree şi ornitină (Kossel; Krebs; C.D. Nenițescu).

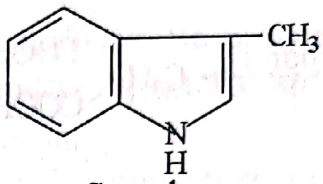


Ciclul ornitinei după Krebs

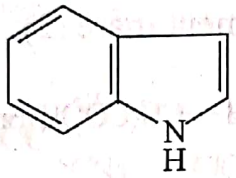
Triptofanul, β–indolilalanină, se găseşte în numeroase proteine; este un aminoacid esenţial şi participă la sinteza multor compuşi deosebit de importanţi din punct de vedere fiziologic. În intestinul gros, ia naştere triptamina prin decarboxilare, sub acţiunea bacteriilor de putrefacţie. Degradarea bacteriană mai avansată duce la scatol, apoi la indol şi la indoxil.



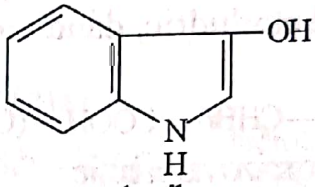
Triptamina



Scatol



Indol



Indoxil

În natură, există un număr mare de aminoacizi, care nu se găsesc în proteine, ci în diferite microorganisme şi materiale vegetale. Dintre aceştia se menţionează: acidul γ–metilenglutamic şi γ–metilenglutamina ce se găsesc în alunele de pământ, acidul γ–metilglutamic prezent în diferite specii de ferigi, acidul γ–aminobutiric, ca şi L– homoserina mult răspândiţi în plante, aliina ce se găseşte în usturoi şi mulţi alţi aminoacizi neproteici.

8.7. SINTEZE DE AMINOACIZI

Aminoacizii sunt necesari la obţinerea unor preparate pentru studii biologice, pentru obţinerea de polipeptide, unii aminoacizi sunt folosiţi în medicină sau se adaugă în produse alimentare.

Sintezele de aminoacizi se fac prin diferite metode chimice, dintre care se vor prezenta cele mai importante.

1. *Aminarea acizilor halogenaţi*. Reacţia acizilor halogenaţi cu amoniacul este o metodă generală de preparare a aminoacizilor alifatici:

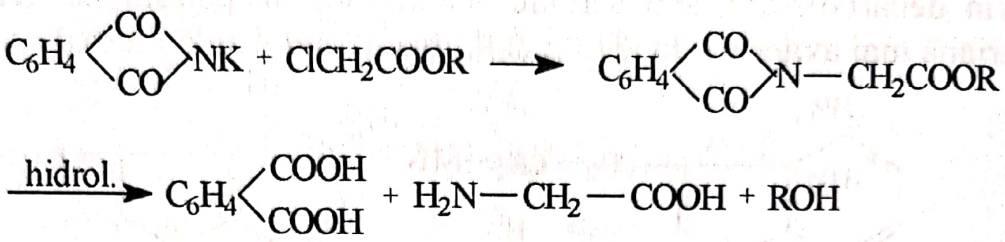
$$ClCH_3—COOH + 2\,NH_3 \rightarrow H_2N—CH_2—COOH + NH_4Cl$$

Acid cloracetic — Glicocol

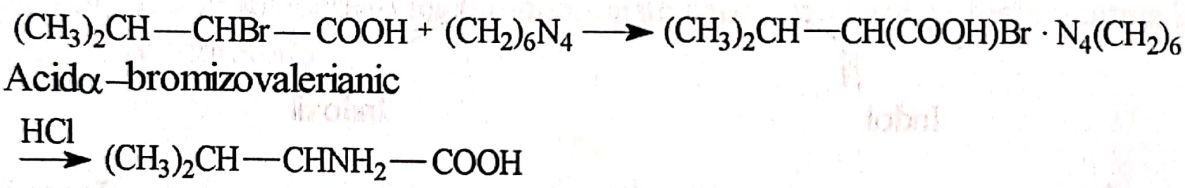
$$CH_3—CHBr—COOH \rightarrow CH_3—CH(NH_2)—COOH$$

Acid α–brompropionic — Alanina

Pentru sinteza aminoacizilor, se poate începe şi de la ftalimida potasică, pornindu-se de la esterii acizilor α–halogenaţi (2):



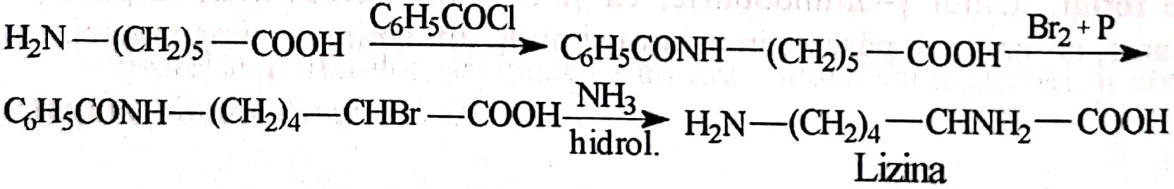
Aminarea acizilor α–halogenaţi se poate realiza şi cu hexametilentetramină, care formează cu aceşti acizi un aduct ce se descompune prin încălzire cu acid clorhidric, dând aminoacidul cu randament mare (2):



Acidoα–bromizovalerianic

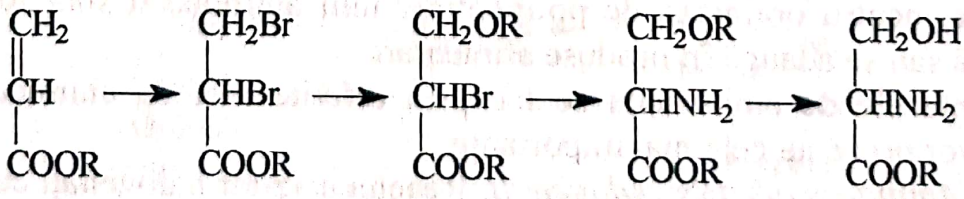
Valina

Lizina se prepară din acidul ε – aminocapronic:

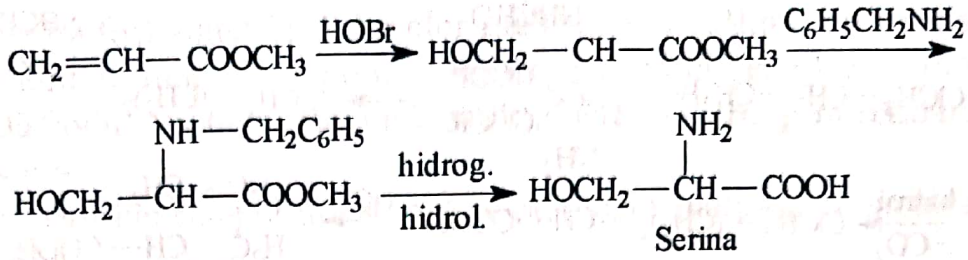


Lizina

Serina a fost sintetizată din esterul acidului acrilic:

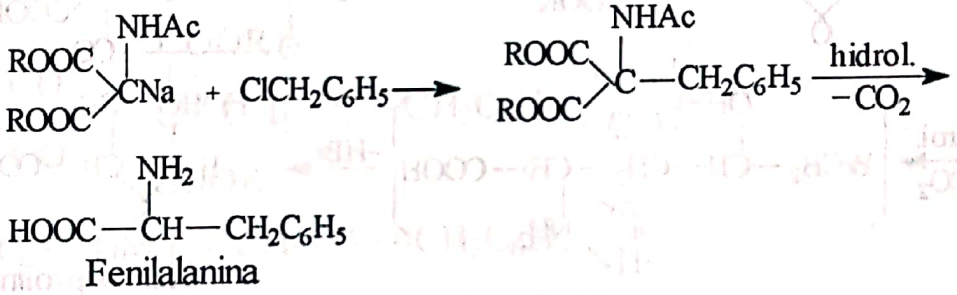


O altă cale de sinteză a serinei constă în condensarea bromhidrinei acrilatului de metil cu benzilamină (2):

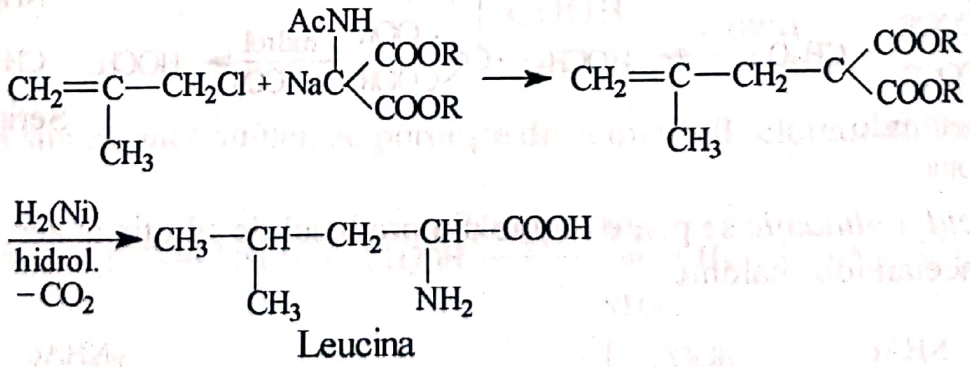


2. *Metode pornind de la esterul aminomalonic.* Se utilizează esterul aminomalonic N–acetilat (esterul acetamidomalonic), esterul aminomalonic N–formilat sau esterul aminomalonic N–benzoilat.

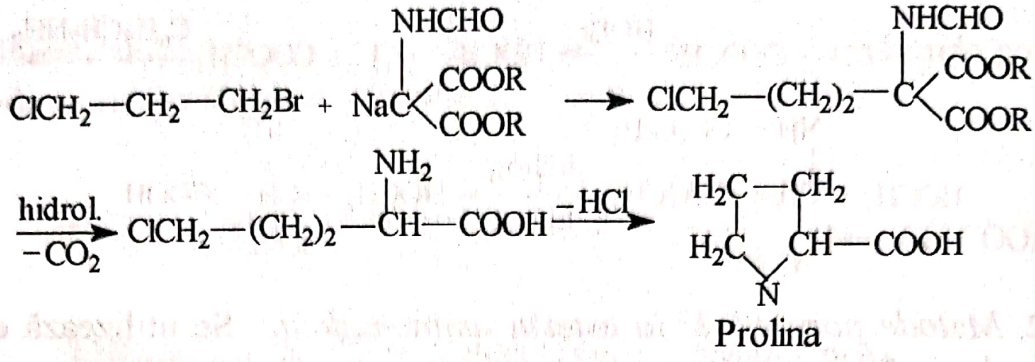
Alanina, valina, leucina şi *fenilalanina* pot fi sintetizaţi prin condensarea esterului N–acetilamino–malonic sodat cu compuşi halogenaţi adecvaţi şi hidroliză ulterioară:



Leucina a fost obţinută prin condensarea esterului N-acetilamino-malonic sodat cu clorură de metalil:

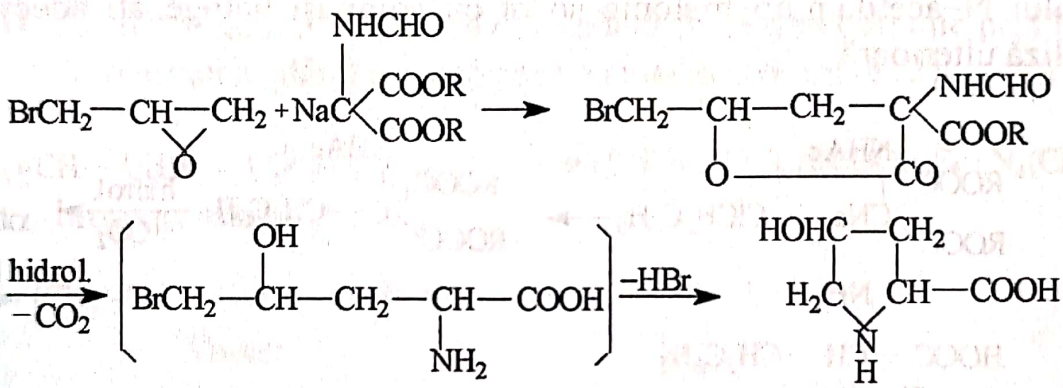


Prolina s-a sintetizat prin condensarea esterului formamido-malonic cu 1-clor-3-brompropan:



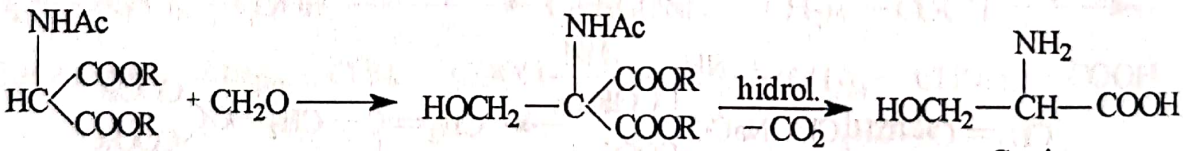
Prolina

Hidroxiprolina s-a sintetizat pe aceeaşi cale ca şi prolina, pornindu-se de la epibromhidrină:



Hidroxiprolina

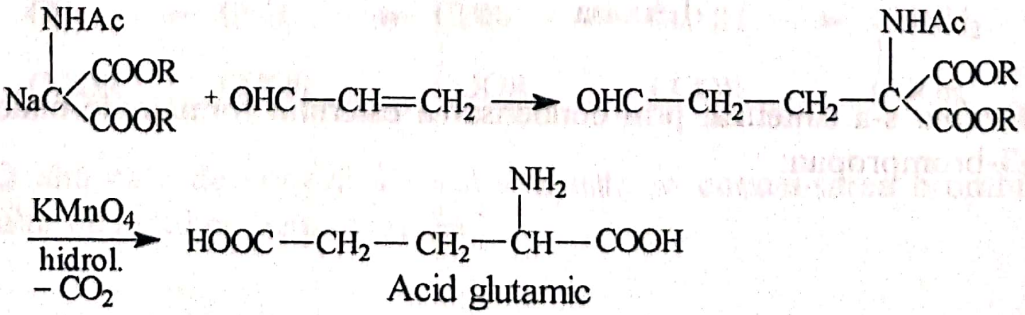
Serina se poate sintetiza din esterul acetamido-malonic, prin condensare cu formaldehidă:



Ester acetamido malonic

Serina

Acidul glutamic se poate obține din produsul de adiuție al acroleinei la esterul acetamido-malonic:



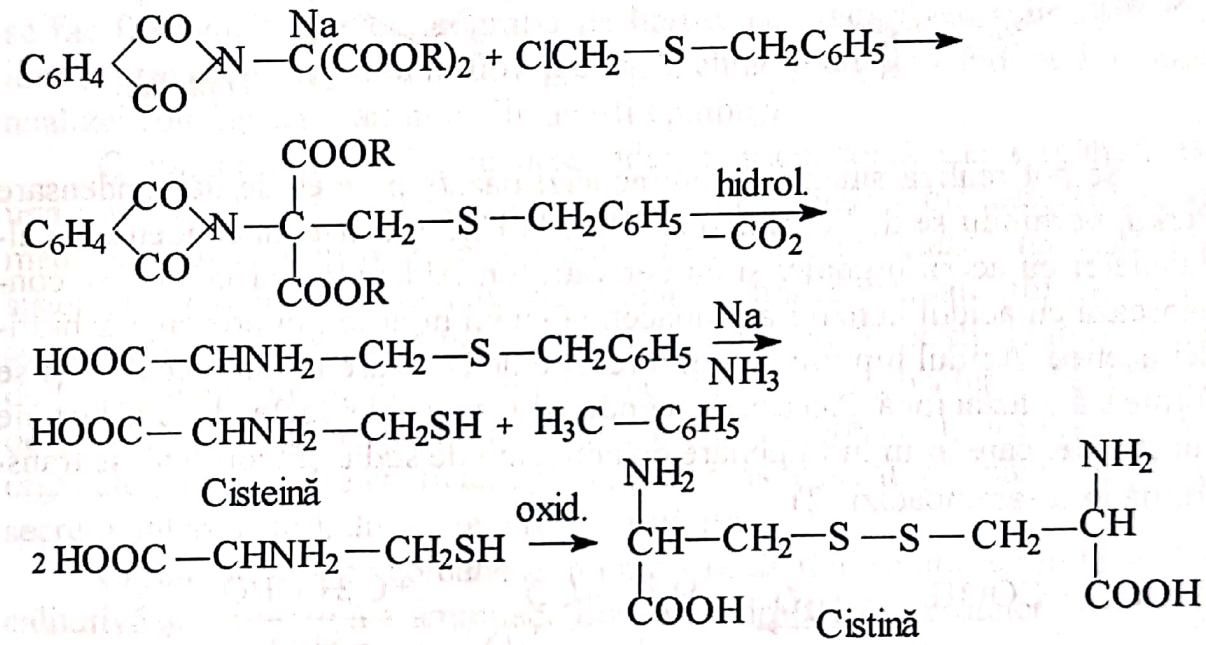
Acid glutamic

Cistina a fost sintetizată din clor metil-benzil-sulfură, prin condensare cu ester ftalimido-malonic şi apoi hidroliză, iar restul benzil se elimină prin reducere cu sodiul metalic. Rezultă, astfel, cisteina care, prin oxidare, trece uşor în cistină.

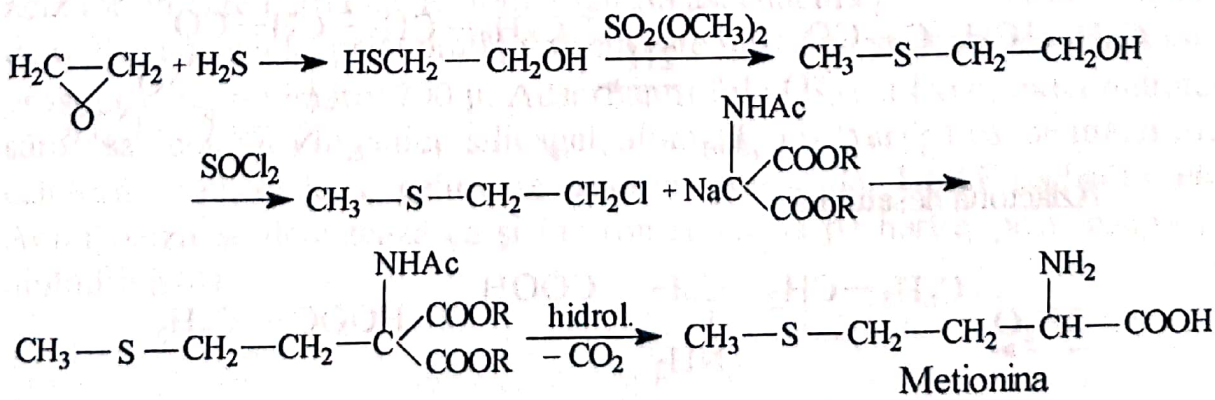
Clor metil-benzen-sulfura se obţine pe o cale analoagă cu sinteza eterului clormetilic:

$$CH_2O + HCl \rightarrow ClCH_2OH + C_6H_5{-}CH_2SH \rightarrow C_6N_5CH_2{-}S{-}CH_2Cl + H_2O$$

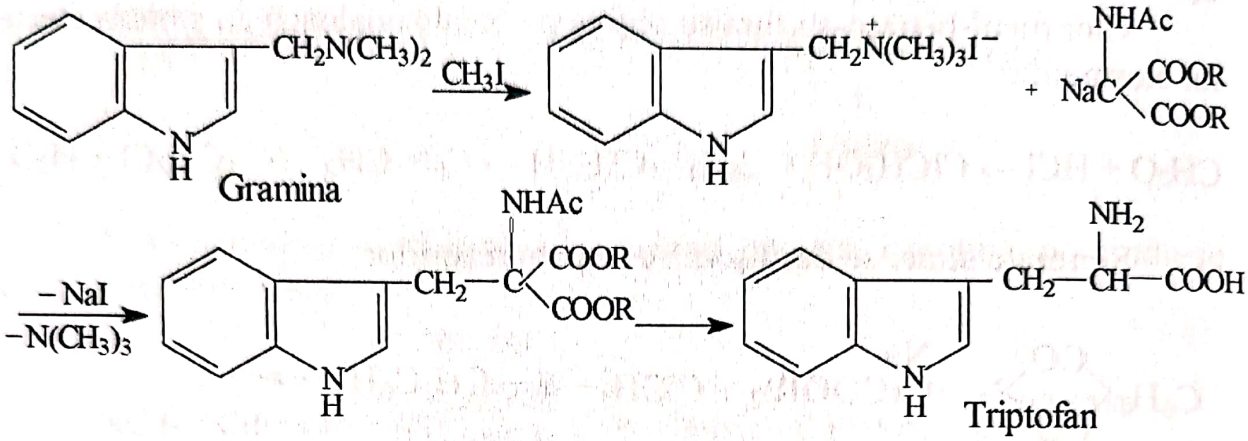
Sinteza cistinei se desfăşoară conform reacţiilor:



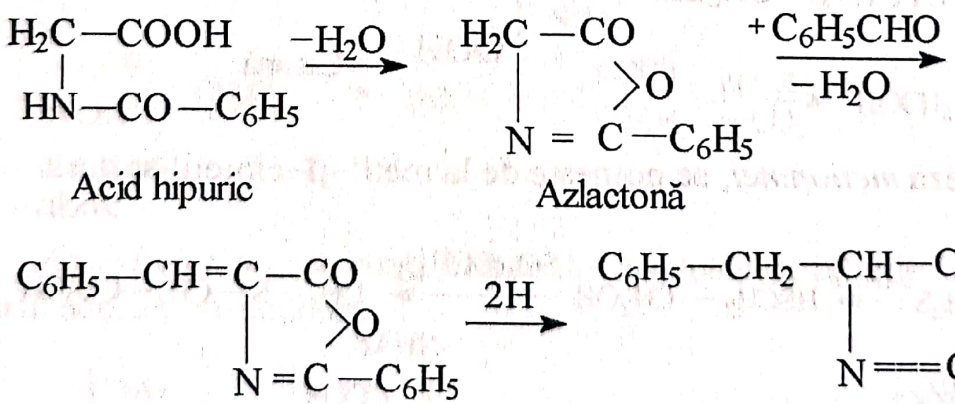
La sinteza *metioninei*, se porneşte de la metil–β–cloretil-sulfură:

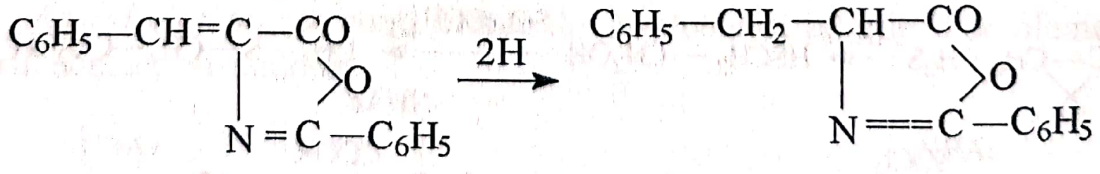


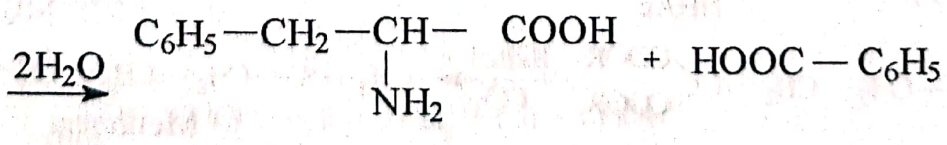
Triptofanul s-a sintetizat pornindu-se de la gramină, un compus ce se obține din indol, prin sinteză Mannich. Sarea cuaternară a graminei se comportă față de esterul acetamido-malonic ca un compus halogenat (2):



Se pot realiza sinteze de aminoacizi bazate pe metode de condensare Perkin pornindu-se de la azlactone. Metoda Perkin constă în condensarea aldehidelor cu acizii organici şi cu derivații lor. Aldehidele aromatice se condensează cu acidul benzoil-aminoacetic (acidul hipuric), în prezența anhidridei acetice. Acidul hipuric suferă o reacție de ciclizare intramoleculară şi se formează o azlactonă. Aceasta se condensează cu aldehidele, dând azlactone substituite, care, prin hidrogenare cu amalgam de sodiu şi hidroliză, se transformă în α–aminoacizi (2):







Metoda prezentată se aplică la sinteza aminoacizilor cu nuclee aromatice sau heterociclice, conținând restul alaninic $-CH_2-CHNH_2-COOH$. Astfel, s-au obținut: tirozina, pornindu-se de la p-hidroxibenzaldehida, triptofanul, de la β–aldehida indolului și histidina, de la aldehida imidazolului.

În literatura de specialitate și în tehnică, sunt prezentate numeroase căi de sinteză a aminoacizilor: prin tratarea aldehidelor cu acid cianhidric și amoniac (în practică, de fapt, cu cianură de sodiu sau potasiu și amoniac), se obțin nitrilii α–aminoacizilor care se supun, apoi, hidrolizei pentru obținerea aminoacizilor; metode bazate pe condensări Perkin; metode bazate pe reducerea derivaților funcționali azotați ai acizilor α–cetonici etc.

Separarea, purificarea, analiza calitativă și cantitativă a aminoacizilor se fac frecvent prin cromatografia pe hârtie, pe coloană cu schimbători de ioni și prin cromatografia în fază gazoasă, chiar și atunci când mediul supus analizei conține cantități mici din aceşti compuşi.

Cromatografia pe hârtie descendentă, ascendentă sau circulară este una din metodele des folosite în analiza aminoacizilor din amestecuri sau mediile naturale prin diferite procedee, care se diferențiază, mai ales, prin sistemele de dizolvanți, reactivi de culoare și hârtie cromatografică. Astfel, se pot separa aminoacizii liberi și legați, prin metodele existente în literatura de specialitate, din hidrolizatele proteice, din virusuri, bacterii, din plantele de cultură (orez, grâu, porumb, fasole, roșii, mazăre etc.), din țesuturile și organele animale (creier, ficat, splină, pancreas, rinichi, plămâni, glande cu secreție internă etc.), din lapte, brânză, ouă etc.

Cromatografia pe coloane schimbătoare de ioni se utilizează la analiza calitativă și cantitativă a aminoacizilor din hidrolizatele proteice, din amestecuri sau medii naturale în cele patru grupe principale (bazici, neutri, acizi și aromatici), cât și separarea individuală a aminoacizilor.

Se menționează, de asemenea, cromatografia în strat subțire a aminoacizilor, în care hârtia de la cromatografia ascendentă pe hârtie este înlocuită de o placă de sticlă, pe suprafața căreia este întins un strat de adsorbant cu o grosime de aproximativ 200 μ. Adsorbanții folosiți sunt oxizi, oxizi hidratați, săruri sau compuși organici: silicagel, alumină, kiselgur, silicat de magneziu, celuloză, metilceluloză, geluri de dextran, poliamide, DEAE-sephadex etc. Aminoacizii se detectează ca și în cromatografia pe hârtie, prin reacția cu ninhidrină (4).

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă:

1. Lehninger, A.L., *Biochimie*, vol. I şi II, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, 1992.
2. Nenițescu, C.D., *Chimie Organică*, vol. I şi II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
3. Neurath, H., Bailey, K., *The Proteins Chemistry, Biological Activity and methods*, vol. I., Part A, B, Acad Press Inc. Publishers, New York.
4. Tănase, I., *Tehnica Cromatografică*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1997.
5. Graham, L., Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2 nd. Edition, Oxford University Pres.
6. Sakami, W., Harrington, H., Annu. Rev. Biochem., 1998, 32, pp. 355 – 398.
7. Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J., Tumer, N., *J. Nutr.*, 134 (3), pp. 489 – 492, 2004.
8. Urry, D.W., *Chemical Physics Letters*, 399 (1-3), pp. 177 – 183, 2004.
9. Brosnan J., Brosnan M., *J. Nutr.*,136 (6 Suppl.), pp. 1636S – 1640S, 2006.
10. Imura, K., Okada, A., *Nutrition*, 14 (1), pp. 143 – 148, 1998.
11. Fürst, P., Stehle, P., *J. Nutr.*, 134 (6 Suppl.), pp. 1558S – 1565S, 2004.
12. Reeds, P.J., *J. Nutr.*, 130 (7), pp. 1835S – 1840S, 2000.
13. Hart, H., *Organische Chemie*, VCH, 1989.
14. Stryer, L., *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
15. Glaser, R., *Biophysik*, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 1996.
16. Eglin, F., *Bausteine des Lebens*, Ralf Reglin Verlag, 2004.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 9

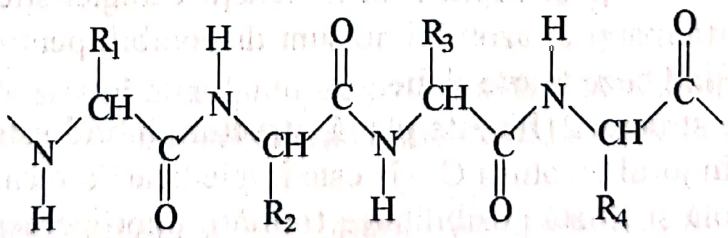
PEPTIDE

9.1. Caracteristici generale 337
9.2. Sinteza peptidelor 341
9.2.1. Sinteza peptidelor pe suport polimer 348
9.3. Peptide naturale biologic active 350

Bibliografie 352

9.1. CARACTERISTICI GENERALE

Peptidele sunt combinațiile cu structură amidică, rezultate din două sau mai multe molecule de aminoacizi, prin eliminare de apă. Între α–aminoacizi, se formează legături peptidice (amidice), care pot conduce la lanțuri macromoleculare polipeptidice:



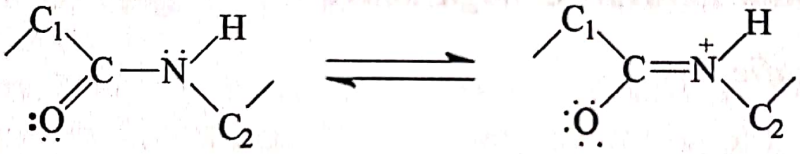
În procesul de biosinteză, ca şi în diferitele reacții chimice dintre aminoacizi, se formează şi alte legături covalente: esterice, tioesterice, disulfidice, ca legături secundare, nu în lanțul peptidic.

Scanned with OKEN Scanner

Numele de *peptide* vine de la *peptone*, fragmente ce se formează la hidroliza parţială a proteinelor naturale. În natură, se găsesc multe peptide de mare importanţă fiziologică.

Ca şi în clasa hidraţilor de carbon, se disting *dipeptide, tripeptide* etc., numite şi *oligopeptide*, care conţin între 2 – 8 aminoacizi. În mod convenţional, se consideră *polipeptide* compuşii care au greutatea moleculară mai mică de 10 000 şi *proteine*, cei cu greutate moleculară mai mare (2). Peptidele pot fi grupate în: *peptide cu catenă liniară, ciclică sau policiclică*. Unele peptide pot fi clasificate după activitatea lor biologică: *hormoni, antibiotice, enzime, toxine, peptide analgezice.*

Legătura peptidică reprezentată ca o structură de rezonanţă în structurile limită I şi II, ca urmare a conjugării p –π din grupa amidică, are distanţa C'–N cu 10 % mai scurtă decât în amine, iar dubla legătură C'–O este cu 0,02Å mai lungă decât cea cunoscută la aldehide şi cetone:



(I) (II)

În structura (I), legătura C–N conţine numai electroni σ axiali, permiţând rotaţia liberă, iar în structura (II), legătura C–N conţine electroni σ şi π, deci este o legătură dublă, rotaţia este împiedicată, iar dipolmomentul este mai mare. Cu ajutorul spectrelor RMN şi din lungimea legăturilor, s-a constatat că structura hibrid conţine aproximativ 60 % (I) şi 40 % (II), electronii π fiind delocalizaţi pe legăturile C–O şi C–N. Datorită acestei conjugări, grupa C = O din amide şi peptide nu dă reacţii caracteristice cetonelor, iar electronii neparticipanţi ai azotului nu sunt disponibili pentru legarea protonului, acestea fiind baze foarte slabe.

Deoarece structura (II) este plană, structura hibrid este, de asemenea, plană. Rotaţia în jurul legăturii C – N este împiedicată din cauza caracterului de legătură dublă şi există posibilitatea formării unor izomeri geometrici cu legătură peptidică *trans*, care este curent întâlnită şi legătură peptidică *cis*, prezentă foarte rar.

Având lungimile legăturilor şi unghiurile relativ rigide, legătura peptidică, în ansamblu, este şi ea rigidă.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a se prezenta conformaţia unui lanţ peptidic, trebuie cunoscute unghiurile diedre φ şi ϕ la atomii C_α.

Lanţurile peptidice sunt relativ voluminoase, flexibilitatea lor este mică, legătura peptidică rigidă, iar amplasarea resturilor laterale ale diferiţilor aminoacizi este, în esenţă, similară. Forţele necovalente ce se stabilesc între lanţurile peptidice sunt: legăturile de hidrogen, legăturile ionice, forţele van der Waals, atracţiile hidrofobe.

Polipeptidele de tip α pot fi etirate aproximativ 100 %, iar direcţia orientării legăturilor de hidrogen, pusă în evidenţă cu ajutorul spectrelor IR polarizate, este, de obicei, axa fibrei, în cazul proteinelor fibrilare.

Spre deosebire de acest tip structural, în polipeptidele β, legăturile de hidrogen sunt perpendiculare pe forţa de orientare şi lanţul nu se poate etira. Lanţul formează structura tip „strat pliat", unde planurilor grupelor peptidice sunt înclinate la un unghi de circa 30° faţă de axa fibrei.

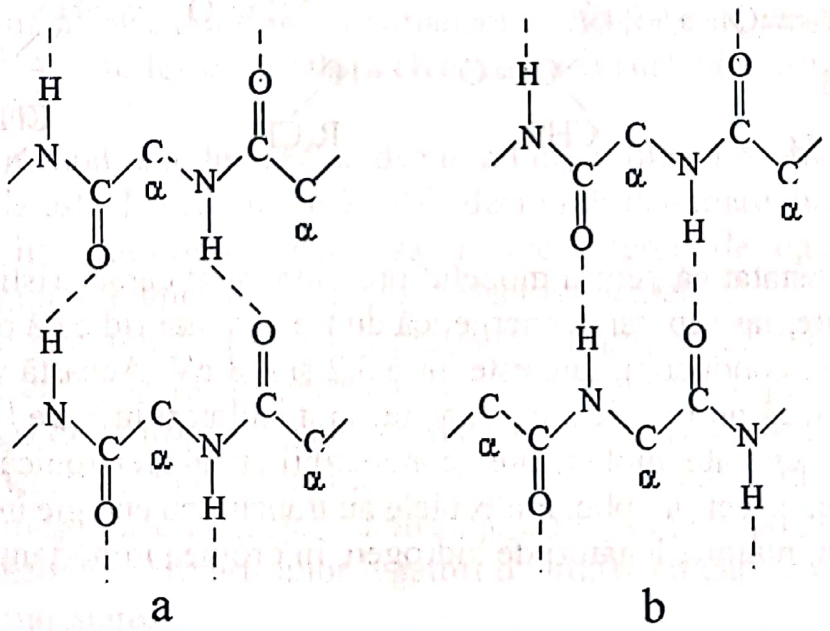


Fig. 9.1. În stratul pliat lanţurile polipeptidice sunt „împachetate" paralel (a) sau antiparalel (b)

În structura stratului pliat, lanţurile polipeptidice pot fi împachetate paralel sau antiparalel (fig. 9.1.). Această deosebire în aranjarea lanţurilor poate fi pusă în evidenţă în spectrul IR polarizat. Studiul spectrelor IR a unor polipeptide şi proteine fibrilare a permis stabilirea unor criterii de deosebire a tipurilor de împachetare, pe baza numărului şi intensităţii benzilor tip „Amidă I".

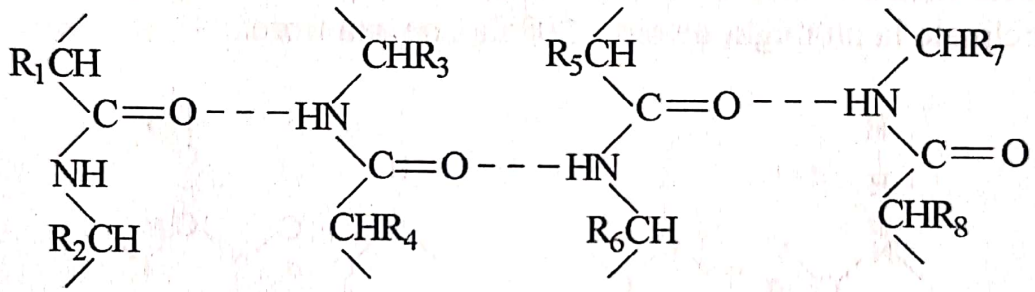
Scanned with OKEN Scanner

Legături de hidrogen există între resturile de aminoacizi din edificiul elicei polipeptidice, ca şi între resturile laterale ale aminoacizilor sau între resturile laterale şi moleculele de apă prezente în condiţii fiziologice.

La denaturarea proteinelor, datorită variaţiei pH-ului sau a temperaturii, se produce ruperea unor legături de hidrogen, mai ales, dintre resturile laterale ale aminoacizilor.

Este posibil ca transferul de energie în sistemele biologice să se realizeze printr-un mecanism analog celui care stă la baza conductibilităţii în cristale.

Un lanţ polipeptidic are, ca element structural fundamental, gruparea peptidică care are patru electroni π. Interacţia acestor electroni are loc prin legături de hidrogen care leagă transversal grupările peptidice şi formează sisteme conjugate care pot da naştere la benzi de energie de tip semiconductor:



S-a constatat că pentru modelul prezentat sunt caracteristice trei benzi relativ înguste, iar separarea energetică dintre cea mai ridicată bandă ocupată şi banda de conductibilitate este între 3,2 şi 4,8 eV. Această valoare mare pare să indice că proteinele pure, izolate, sunt izolatori în stare fundamentală, deoarece, în cristale moleculare, conductibilitatea electronică se observă atunci când, în spectrul optic, moleculele au tranziţii cu energie în jur de 1 eV.

Cele mai întâlnite legături de hidrogen, în ordinea importanţei sunt:

$$O—H\cdots O\,;\ N—H\cdots O\,;\ F—H\cdots F$$

Hidrogenul este legat covalent de unul din atomii electronegativi şi printr-o legătură de tip special (marcată prin puncte în formule) de celălalt atom electronegativ. Legătura de hidrogen nu este o legătură covalentă, deoarece atomul de hidrogen nu poate folosi într-o legătură σ cu un alt element decât orbitalul 1s, care este ocupat complet de doi electroni. Atomul de hidrogen legat covalent se deosebeşte, însă, de toţi ceilalţi atomi, prin particularitatea că norul electronic din jurul său este foarte subţire; sarcina pozitivă a nucleului de H este ecranată spre exterior de numai doi electroni. Pe de altă parte, dacă atomul (X) de care este legat covalent hidrogenul este

Scanned with OKEN Scanner

puternic electronegativ, norul electronic este atras spre acesta, iar nucleul H, mai puțin ecranat, poate exercita o forță de atracție asupra unui alt atom electronegativ (Y). Atracția este cu atât mai puternică, cu cât (Y) are un volum mai mic. Atracția protonului slab ecranat se exercită asupra uneia dintre perechile de electroni neparticipanți ale atomului Y.

Legătura de hidrogen este de natură electrostatică de un tip special, depinzând de prezența unui atom de hidrogen covalent și a doi atomi foarte electronegativi.

Sub denumirea de *legături* sau *forțe van der Waals*, se cuprind mai multe tipuri de interacțiuni între atomii nelegați chimic: forțe de atracție între molecule nepolare, numite *forțe de dispersie* și *forțe de ioni – dipoli* și *dipoli – dipoli*.

Forțele de dispersie se datorează unor interacțiuni mecanic cuantice între atomii unor molecule diferite.

Forțele care se dezvoltă între ioni și molecule polare (dipoli permanenți), precum și între doi dipoli permanenți, sunt forțe de atracție slabe între molecule. Aceste forțe de natură electrostatică sunt mult mai slabe decât sarcinile ionilor.

Experimental, s-a dovedit că distanța între moleculele unite prin forțe van der Waals este de ordinul de 3 – 4Å, deci mult mai mare decât distanțele interatomice în legăturile covalente sau ionice. Energia de legătură van der Waals este mult mai mică decât în cazul electrovalențelor.

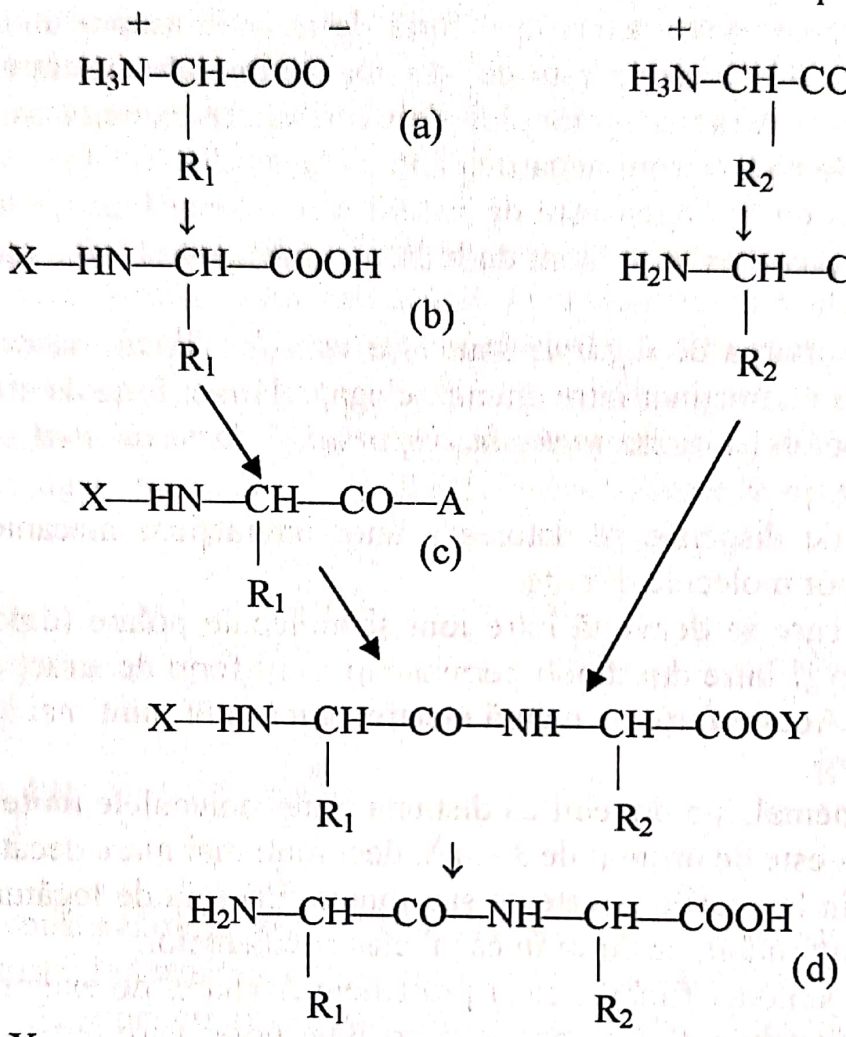
Polimerii sintetici filabili, ca și proteinele fibrilare, de exemplu, conțin grupe polare capabile să formeze legături intermoleculare puternice, dintre care și legături de hidrogen și van der Waals. Prin orientarea și paralelizarea lanțurilor macromoleculare a polimerilor sintetici, în procesul de formare a fibrelor, se micșorează distanțele dintre lanțuri și grupele polare pot ajunge la distanța necesară formării unor legături de hidrogen care conferă fibrelor o rezistență mai mare.

9.2. SINTEZA PEPTIDELOR

Sinteza peptidelor, pornindu-se de la aminoacizi, are loc, principial, prin sinteza fiecărei legături peptidice, pentru care se parcurg următoarele etape: protejarea temporară a funcțiilor ce nu participă la reacție (a); transformarea, de obicei, a grupei carboxil într-un derivat funcțional reactiv (b); formarea legăturii peptidice (c), deprotejarea parțială sau totală a produsului.

Scanned with OKEN Scanner

Operația se repetă pentru fiecare aminoacid sau rest de peptidă (1).



unde: X = grupa protectoare pentru funcția aminică;
Y = grupa protectoare pentru funcția carboxilică;
A = restul activant al carboxilului.

Catenele laterale ale aminoacizilor, prin efectele lor sterice și electronice, pot influența reacțiile în etapele de protejare și de activare. Grupele reactive din catenele laterale (OH, NH_2, COOH, SH) pot da reacții secundare și provoca o anumită labilizare a legăturii peptidice.

În prezent, există o diversitate de grupe protectoare, agenți de activare și metode de condensare.

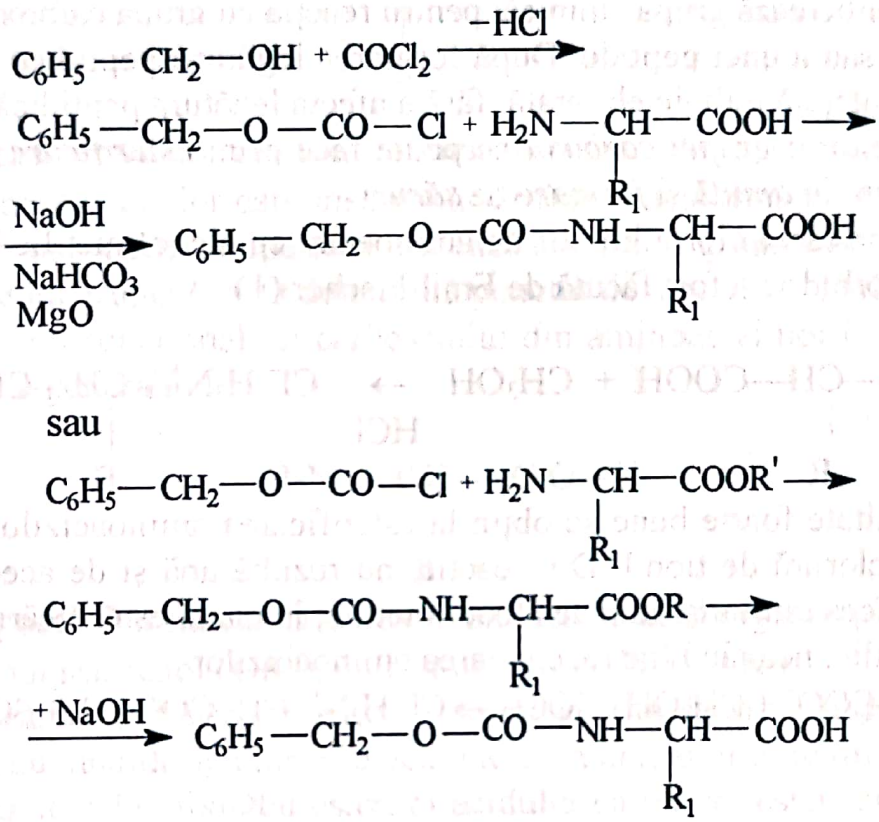
Protejarea grupei amino se poate face prin *acilare, alchilare, transformare în bază Schiff* sau în *sare de amoniu.*

Pentru *acilarea* grupei aminice, s-au dovedit benefice grupele protectoare de tip *uretanic – benziloxicarbonil* și unii *derivați ai acizilor carboxilici cu resturi formil, trifluoracetil și ftalil* (1).

Scanned with OKEN Scanner

Benziloxicarbonil – aminoacizii se obţin uşor din reacţia esterului benzilic al acidului clorocarbonic cu aminoacizii sau cu esteri ai aminoacizilor.

Grupa amino protectoare N–benziloxicarbonil are aplicaţie practică universală şi sunt numeroase procedee convenabile de îndepărtare a ei (1).



sau

Derivaţii acizilor carboxilici formează cu grupa amino legături amidice care sunt dificil de îndepărtat, fără să afecteze legăturile peptidice. Anumite resturi acil sunt, totuşi, eficiente ca agenţi de protejare pentru grupa amino. Astfel, *restul formil* de la derivaţii corespunzători de acizi carboxilici, care se ataşează la funcţia aminică ca grupă de protecţie, poate fi uşor îndepărtat prin hidroliză în mediu acid; *restul trifluoracetil*, datorită influenţei puternic electronegative a celor trei atomi de fluor, poate fi îndepărtat prin tratare cu alcalii; iar *grupa ftalil* se îndepărtează prin hidroliză.

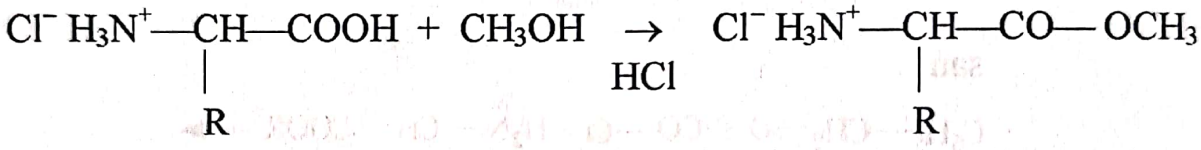
Bazele Schiff ale aminoacizilor sunt puţin stabile pentru a se putea folosi, ca grupe protectoare, la sinteza peptidelor. Protejarea prin formarea de N–benziliden derivaţi este folosită pentru protejarea temporară a grupei ω–amino din diaminoacizii monocarboxilici. În aceste condiţii, grupa α–amino rămasă liberă se poate acila. Chiar în condiţii riguroase de reacţie, în mediu alcalin, nu se poate evita o transpoziţie de la Nω la Nα şi întotdeauna se obţin cantităţi mai mari sau mai mici de derivat Nω–acil –Nα–benziliden.

Esterii aminoacizilor care au tendința de a cicliza la dicetopiperazine, respectiv de a forma produși de policondensare liniară, pot fi obținuți sub formă stabilă numai ca săruri (obișnuit, clorhidrați). Clorurile acide ale aminoacizilor sau peptidelor pot fi obținute numai sub formă de amoniu (1).

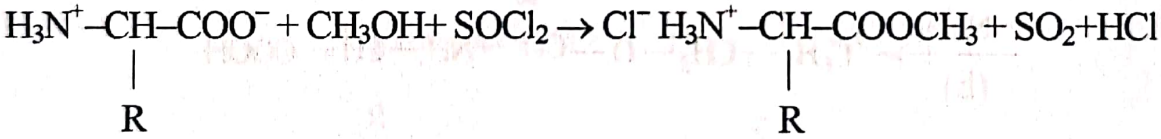
Protejarea temporară a *grupei carboxilice* asigură anularea stării de amfion și eliberează grupa aminică, pentru reacția cu grupa carboxilică a altui aminoacid sau a unei peptide. După formarea legăturii peptidice, grupa carboxilică protejată trebuie eliberată, fără a afecta legătura peptidică formată.

Protejarea grupei carboxil se poate face prin: *esterificare* cu *alcooli*, *transformare* în *amidă* și *formare* de *săruri*.

Esterificarea clorhidraților de aminoacizi cu alcool metilic în prezența acidului clorhidric a fost făcută de Emil Fischer (1):



Rezultate foarte bune se obțin la esterificarea aminoacizilor cu alcool metilic și clorură de tionil. Din reacție, nu rezultă apă și de aceea se folosește un exces mult mai mic de alcool metilic, în cazul esterificării numai cu alcool metilic, neavând loc racemizarea aminoacizilor.



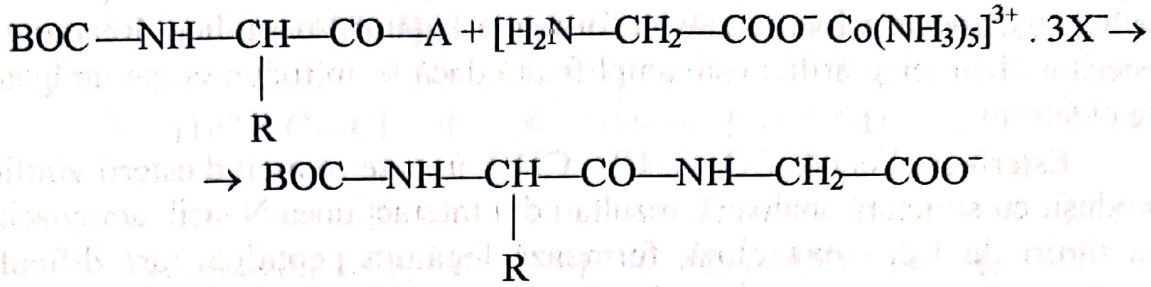
O altă posibilitate de esterificare a aminoacizilor și a peptidelor este trans-esterificarea în cataliză acidă, cu ajutorul unui ester ușor accesibil.

Esterii etilici se obțin prin aceleași metode, ca și cei metilici și au aproximativ aceleași proprietăți. Esterii benzilici se pot obține, cu randamente bune, sub formă de săruri cu acidul–p–toluensulfonic, prin metoda esterificării azeotrope. Protejarea grupei carboxil, prin transformare în amidă, se recomandă numai atunci când scindarea legăturii amidice este posibilă, fără a fi atacate și legăturile peptidice, foarte asemănătoare din punct de vedere chimic.

Protejarea grupei carboxil a aminoacizilor prin formare de săruri se bazează pe faptul că neutralizarea grupei carboxil mărește nucleofilia grupei amino. Se folosesc sărurile aminoacizilor sau peptidelor cu metale alcaline sau alcalinopământoase, în soluții apoase sau în solvenți organici.

Dacă peptidele nu sunt prea hidrofile, se poate lucra și cu săruri de amoniu sau cu săruri complexe ale metalelor tranziționale. Formarea legăturii peptidice se realizează, prin metodele generale, cu randamente de peste 90 (1).

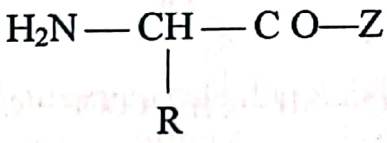
Scanned with OKEN Scanner



Sinteza peptidelor are loc, cel mai frecvent, prin activarea grupei carboxil a α–aminoacizilor care înseamnă, de fapt, transformarea sa într-un derivat funcțional reactiv, după care urmează reacția cu grupa amino.

Prezența grupei C = O determină punctul de atac al nucleofililor.

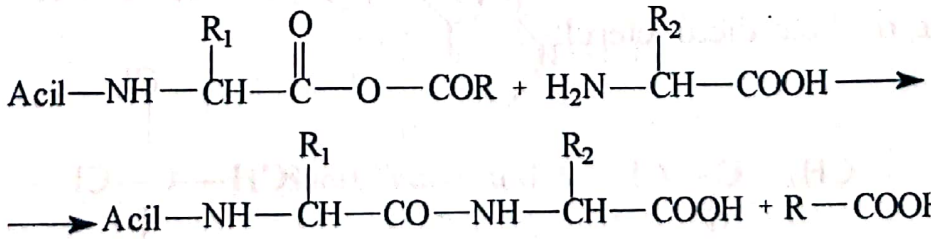
Derivații funcționali ai carboxilului din aminoacizi pot fi reprezentați prin formula generală:



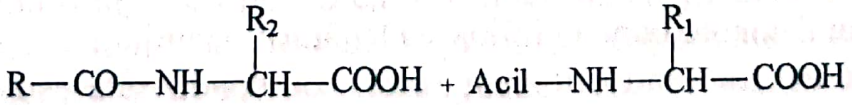
în care Z poate fi o halogenură acidă, un rest de acid organic ($OCOR'$), un rest de alcool sau fenol (OR'), un rest de amidă ($NH—R'$).

Activarea grupei carboxilice a aminoacizilor la sinteza peptidelor se poate face cu: anhidride mixte cu acizii anorganici, anhidride mixte cu acizii organici, anhidride mixte cu esteri ai acidului carbonic; esteri arilici substituiți, esteri enolici; N–acil–azoli şi folosirea reactivilor activanți.

Activarea grupei carboxilice cu anhidride ale aminoacizilor cu acizii anorganici şi organici a fost mult studiată şi aplicată în practică. Unele au dezavantajul că, alături de peptidă, se formează şi un acil derivat nedorit:

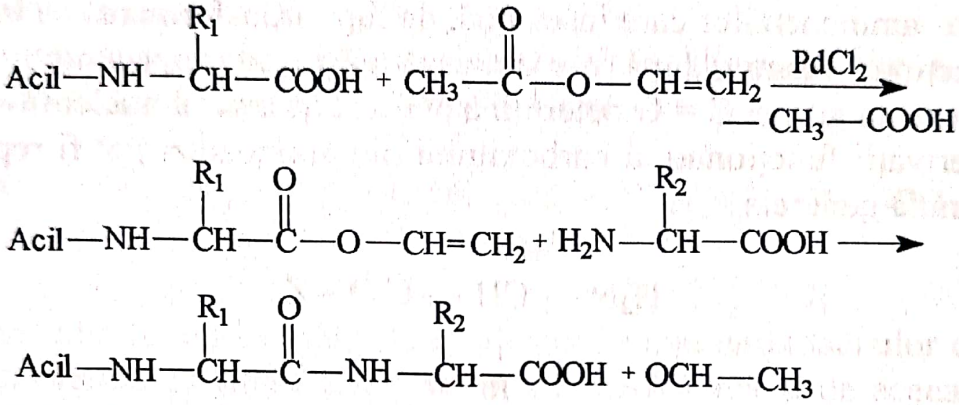


de asemenea,



Faţă de amine, esterii alchilici sunt mai puţin reactivi, în timp ce esterii arilici reacţionează foarte uşor la formarea legăturii peptidice. Reactivitatea esterilor alchilici şi arilici este amplificată dacă se introduc grupe atrăgătoare de electroni.

Esterii enolici (R–CO–O–CH=CH_2), în care se includ esterii vinilici şi produşii cu structură analoagă, rezultaţi din interacţiunea N–acil–aminoacizilor cu săruri de 1,2 – oxazolină, formează legătura peptidică fără dificultăţi, numai pentru componentele amino fără implicaţii sterice:



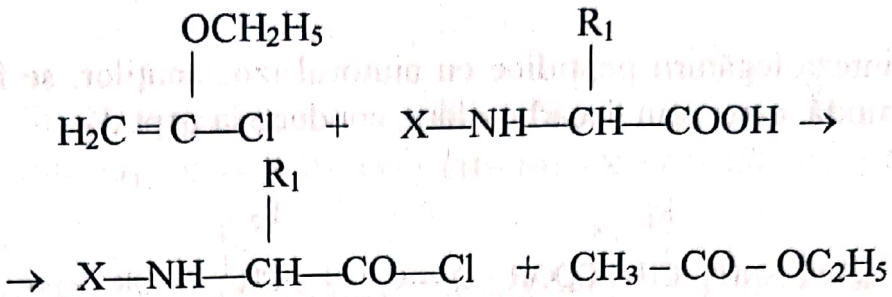
În mediul de reacţie, se adaugă esteri malonici sau cianacetici, pentru a se combina cu acetaldehida rezultată din reacţie, care are tendinţa de a se combina cu grupele aminice ale aminoacizilor.

Pentru a se suprima etapa de activare a funcţiilor implicate în formarea unei noi legături peptidice, s-au experimentat o serie de reactivi activanţi, cu ajutorul cărora etapa de activare şi cea de formare a legăturii peptidice au loc concomitent. Astfel de reactivi sunt unii esteri nesaturaţi, carbodiimide, cianamide, cetenimine, cetene.

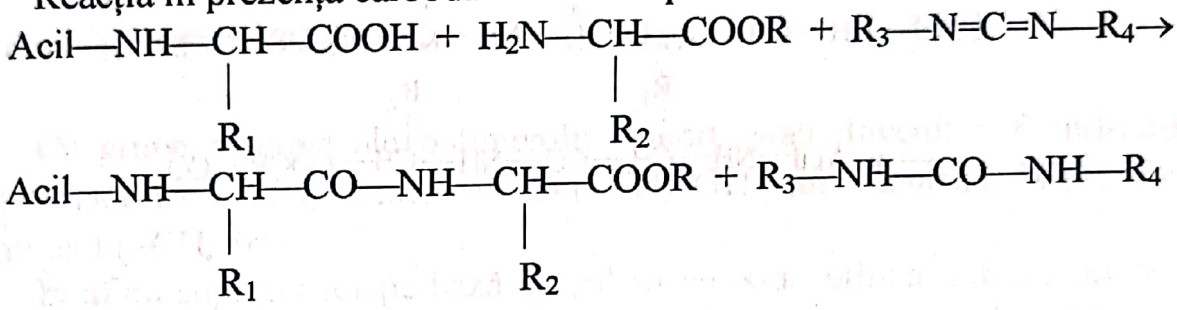
Din rândul esterilor nesaturaţi, se menţionează α–clor–vinil–etil–eterul şi α, α–diclordietil–eterul:

care asigură randamente bune la formarea legăturii peptidice.

În cazul α–clor–vinil–etil–eter, reacţia de condensare este precedată de adiţia componentei carboxil la dubla legătură a reactivului, cu formarea unei cloruri acide reactive, care acilează componenta amino (1):

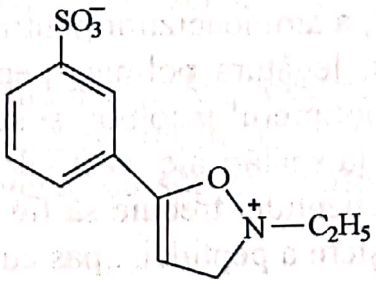


Reacția în prezența carbodiimidelor se produce astfel:



Cea mai folosită carbodiimidă este diciclohexilcarbodiimida.

Reactivul Woodward K (3'–sulfonatul de 2–etil 5–fenil–1,2–izoxazoliu) este cea mai folosită sare de oxazoliu la sinteza peptidelor. Cu acest reactiv se pot prepara dipeptide ale glutaminei, asparaginei şi hidroxiaminoacizilor, fără a mai fi necesară protejarea funcțiilor neimplicate în formarea legăturii peptidice. La sinteza peptidelor, se produce o racemizare redusă.

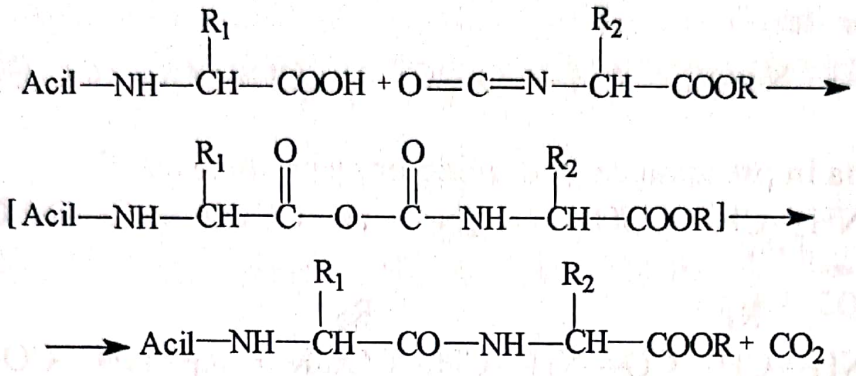


Sarea Woodward R

Grupa aminică a unui aminoacid, spre deosebire de grupa carboxilică, poate forma o legătură peptidică prin intermediul perechii de electroni neparticipanți de la atomul de azot. În practică, pentru sinteza peptidelor, activarea grupei aminice se face cu intermediari reactivi asemănători celor de la grupa carboxilică. Se menționează formarea legăturii peptidice cu ajutorul

izocianaţilor, anhidridelor aminelor acidului fosforos şi cu esterii acidului fosfonic.

La sinteza legăturii peptidice cu ajutorul izocianaţilor, se formează o anhidridă mixtă, care, prin decarboxilare, conduce la peptidă:



9.2.1. SINTEZA PEPTIDELOR PE SUPORT POLIMER

La sinteza peptidelor prin metoda *„pas cu pas"* sau la *„condensarea fragmentelor peptidice"*, se desfăşoară o activitate foarte laborioasă pentru separarea şi purificarea peptidelor rezultate. Formarea catenei peptidice pe un suport polimer simplifică mult aceste operaţii intermediare (1). Prima legătură, de obicei, esterică, are loc între grupa reactivă a suportului polimer insolubil cu grupa carboxil a aminoacidului N–protejat, după care se face condensarea, „pas cu pas", a aminoacizilor pentru formarea lanţului peptidic.

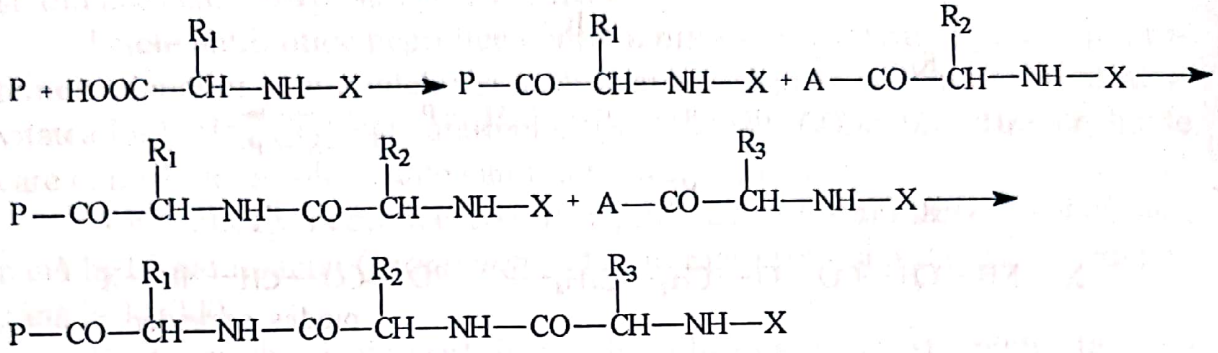
La sfârşitul sintezei, legătura polimer–peptidă este scindată, peptida solubilă este separată de polimerul insolubil şi supusă purificării. Operaţiile de purificare se limitează la spălări ale reactivilor în exces şi ale produşilor secundari solubili. Lanţul peptidei trebuie să fie bine legat de polimerul insolubil, ar reacţiile de creştere a peptidei, „pas cu pas", trebuie să se producă mereu cu un randament cât mai apropiat de 100 %.

Suportul este, de obicei, un polimer sintetic care are grupe reactive. Grupa amino protejată nu poate reacţiona cu polimerul. Polimerul trebuie să fie insolubil în toţi solvenţii folosiţi, să prezinte o formă fizică stabilă şi să conţină o grupă reactivă la care să se poată lega uşor aminoacidul, printr-o legătură covalentă.

Merrifield R.B., care a prezentat, pentru prima dată, modul de sinteză a peptidelor pe suport polimer, a selectat polistirenul reticulat cu 1 – 2 % divinil-benzen, sub formă de particule de 20 – 80 μ, complet insolubil în

Scanned with OKEN Scanner

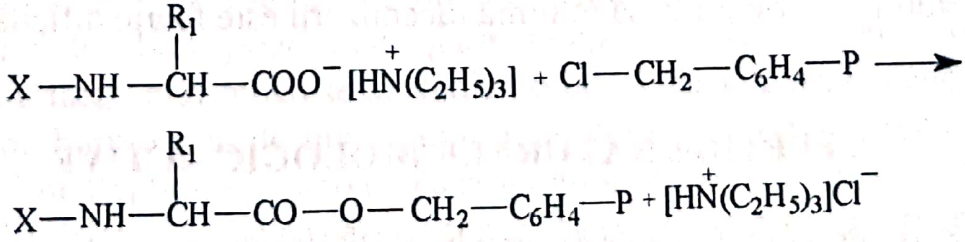
solvenţii obişnuiţi şi care se umflă în diclormetan, dimetilformamidă, dioxan, cloroform.



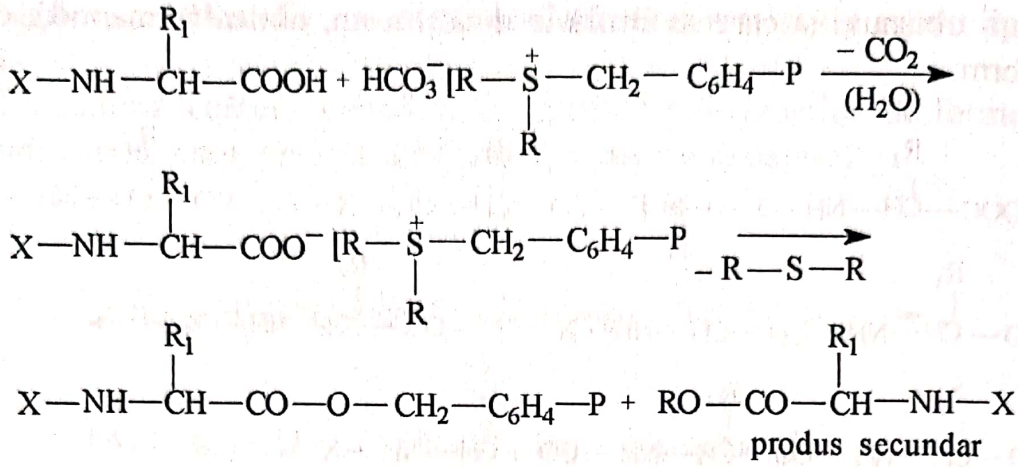
Ca grupe reactive ale polimerului suport, s-au dovedit a fi indicate grupele: clormetil (–CH_2Cl, hidroximetil (–CH_2–OH), sulfonamina (–SO_2–NH_2), brommetil (–CH_2Br) etc.

În afara suporturilor pe bază de polistiren, s-au utilizat diferiţi polifenoli, rezitoli metilaţi la OH–ul fenolic şi clormetilaţi în nucleu. S–a propus ca suport un polimer solubil, polietilenglicolul (HO–PRG–OH), cu care sinteza de peptide are loc în soluţie, spre deosebire de prepararea peptidelor pe suport solid, care se execută în fază heterogenă. În timp ce la sinteza în fază heterogenă, controlul secvenţei se poate face numai după scindarea produsului de pe suportul solid, în cazul polimerului solubil, există posibilitatea controlului analitic, fără scindarea de pe polimer. Atunci când se constată o greşeală de secvenţă, se poate face purificarea intermediară a peptidei. Peptida ajunsă la dimensiunea dorită se scindează prin aminoliză, transesterificare sau hidroliză.

Metoda cea mai folosită pentru legarea aminoacizilor N–substituiţi pe suportul polimer clorometilat, constă în încălzirea sării de trietilamoniu a primului aminoacid N–protejat, cu suportul suspendat în alcool etilic, sau alţi solvenţi, la reflux (1):



În condiţii foarte blânde, se obţine aminoacil–polimerul cu randament de 90 %, dacă se folosesc suporturi bazice de dialchil–(arilmetil)–sulfoniu (1):



Polimerul suport pe care s-au fixat primii aminoacizi C–terminali este gonflat şi spălat cu un solvent adecvat, după care se scindează grupa N– protectoare pentru a elibera funcţia amino. Reactivii de deprotejare şi substanţa scindată sunt spălaţi. Dacă grupa N–protectoare a fost scindată cu un acid, grupa amino eliberată este blocată prin protonare, pentru care motiv se tratează cu o bază terţiară, după care polimerul suport, cu primul aminoacid fixat, se spală pentru îndepărtarea excesului de reactiv. Urmează formarea legăturii peptidice şi construirea, pas cu pas, a lanţului peptidic, prin tratarea succesivă cu aminoacizi acilaţi la grupa carboxilică şi cu grupa aminică protejată etc. şi, în final, are loc scindarea peptidei formate de pe polimerul suport (1).

La sinteza peptidelor, poate avea loc un proces de racemizare care este nedorit. Se ştie că toţi aminoacizii, în afară de glicină, sunt optic activi. La sinteza unei peptide, poate avea loc introducerea în catenă a unui anumit enantiomer care poate provoca racemizarea şi producerea unui amestec de peptide. De obicei, se racemizează restul de aminoacid ce se acilează. Sub influenţa bazelor, se formează un carbanion la atomul de carbon asimetric din poziţia α. Mobilitatea protonului din poziţia α este determinată de substituenţii legaţi de atomul de carbon asimetric, de grupele α–amino şi α–carboxil–protectoare, precum şi de natura catenei laterale (1). Separarea amestecului de diastereo-izomerie produsă în urma racemizării este foarte dificilă.

9.3. PEPTIDE NATURALE BIOLOGIC ACTIVE

O serie de peptide naturale au acţiuni biologice, precum: *antibiotice, enzime, hormoni, toxine.* În acest domeniu, cercetările s-au axat pe stabilirea structurii unor peptide biologic active, corelaţia dintre structură, activitatea biologică şi sinteza unor peptide cu activitate biologică.

Scanned with OKEN Scanner

Se cunosc peste 200 de *antibiotice* cu structură peptidică şi depsipeptidică. Unui număr însemnat de astfel de peptide li s-au determinat structura şi, din acestea, o parte au fost sintetizate.

Unele antibiotice peptidice conţin aminoacizi care nu se găsesc în proteinele plantelor şi animalelor şi a căror prezenţă probabil că determină activitatea lor biologică. Unele antibiotice peptidice conţin, în structura lor, lipide care contribuie la solubilitatea antibioticului în grăsimi.

Antibioticele peptidice conţin peptide cu doi aminoacizi (*penicilina*), până la 15 aminoacizi (*gramicidina A*) sau mai mulţi şi au masa moleculară până la 14 000.

Dintre antibioticele peptidice şi depsidice care au fost sintetizate şi experimentate, se menţionează: *grupa actinomycinei, grupa tirotricinei, tirocidinei* şi *gramicidinei, grupa polimyxinei, grupa stafilomycinei S, ostreogrycinei B, vernamycinei B, etamycinei, mikamycinei*.

Hormonii peptidici şi *proteici* sunt formaţi din lanţuri liniare de α–aminoacizi, dintre care şi cisteina, care formează, în unele cazuri, legături transversale între lanţuri sau inele ciclice.

Numărul aminoacizilor din catenă variază de la 6 (*eledoizina*) la 188 (*hormonul uman de creştere*).

Din rândul acestor hormoni, se menţionează:

– hormonii glandei hipofize (hipofiza posterioară – *oxitocina, vasopresina*; hipofiza anterioară – *adreno-corticotropina, tireotropina, somatotropina, prolactina, hormonul luteinizant, hormonul foliculostimulant;* hipofiza parţial intermediară şi parţial anterioară – *melanotropina*;

–hormonii pancreatici – *insulina, glucagonul*;

–hormonii tisulari – *angiotensinele, bradikinina, kalidina, eledoisina; substanţa P*;

–hormonii tractului gastrointestinal – *gastrina, secretina.*

S-au identificat o serie de peptide cu acţiune toxică (*toxine*) ca *apamina* din veninul de albine, *phalloidina* şi *amantina* din ciupercile otrăvitoare etc.

S-au făcut mari progrese în studiul, producerea şi aplicarea unor peptide cu acţiune hormonală, de importanţă imunologică deosebită, bioregulatori, neuropeptide implicate în activitatea sistemului nervos central, noi antibiotice etc. Sunt realizate peptide pe cale de sinteză sau prin extracţie din surse naturale.

Scanned with OKEN Scanner

Bibliografie selectivă:

1. Cuiban, F., Lupea, A-X, *Studiul structurii şi sinteza peptidelor*, Editura Academiei Române, Bucureşti, 1989.
2. Nenițescu, C.D., *Chimie organică*, vol. I şi II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
3. Chiriță, G., Chriță, M., *Chimia pielii*, ed. a II-a, Editura I.P.Iaşi, 1987.
4. Dickerson, E.R., Geis, I., *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim / Bergstrasse, 1971.
5. Popescu, A., Cristea, E., Zamfirescu-Gheorghiu, M., *Biochimie medicală*, Editura Medicală, Bucureşti, 1980.
6. Lehninger, A.L., *Biochimie*, vol. I şi II, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, 1992.
7. Needleman, S., *Protein Sequence Determination*, ed. II, Springer, Heidelberg, 1975.
8. Dayhoff, M.O., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Natl. Biom. Res. Foundation, vol. I – V, Washington, 1976.
9. Fasold, H., *Die Struktur der Proteine*, Verlag Chemie, 1972.
10. Needleman, S., *Protein Sequence Determination*, ed. II, Springer, Heidelberg, 1975.
11. Dayhoff, M.O., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Natl. Biom. Res. Foundation, vol. I – V, Washington, 1976.
12. Fasold, H., *Die Struktur der Proteine*, Verlag Chemie, 1972.
13. Erickson, B., Merrfield, R., *The Proteins*, vol.II, ed. III, Ed. H. Neurath, R. Hill, New York, Academic Press, 1976.
14. Birr, C., *Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis*, Ed. K. Hafner, Springer Verlag, Berlin, Heidelgerg, New York, 1978.
15. Schmidt, G., „Recent Developments in the Field of Biologicaly Active Peptides", în *Topics in Current Chemistry*, vol. 136, Springer, Berlin 1986.
16. Bădilescu, I.I., Bădilescu, S., *Legătura de hidrogen*, Editura Ştiințifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1981.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 10

BIOSINTEZA PROTEINELOR

10.1. Traducerea mesajului genetic la biosinteza proteinelor 353
10.2. Inhibitori ai sintezei proteice 358
10.3. Poliribozomii 360
10.4. Mitocondriile 362
10.5. Codificarea informației genetice 363
10.5.1. Originea și evoluția codului genetic 366
10.6. Purificarea proteinelor 369

Bibliografie 372

10.1. TRADUCEREA MESAJULUI GENETIC LA BIOSINTEZA PROTEINELOR

Dintre procesele celulare cu consum de energie liberă care se realizează ca lucru chimic *(biosinteza)*, lucru mecanic (*contracția* și *motilitatea*) sau ca urmare a procesului osmotic sau al concentrației (*transportul activ*), cea mai complexă este *biosinteza* majorității compușilor moleculari celulari, pornindu-se de la precursori simpli. În celule, are loc biosinteza biomoleculelor neinformaționale (hidrați de carbon, lipide, aminoacizi și nucleotide) și a biomoleculelor informaționale (acizi nucleici și proteine).

La biosinteza proteinelor, formarea legăturilor peptidice între aminoacizi are loc pe ribozomi, formarea lanțului polipeptidic, producându-se în direcția amino → carboxil.

Informația genetică conținută în secvența de nucleotide a ARNm este tradusă în structura proteică prin mecanisme, în care, pe ribozomi, este construit lanțul polipeptidic din secvența corespunzătoare de aminoacizi, conform informației genetice transferate de ARNm.

Sinteza lanţului polipeptidic are loc în patru etape principale: *activarea, iniţierea, alungirea (elongaţia)* şi *terminarea.* În fiecare etapă, acţionează enzime specifice şi cofactori.

În prima etapă, *activarea*, care are loc în citoplasma solubilă, aminoacizii sunt esterificaţi cu acizii ribonucleici de transfer (ARNt = corespunzători prin acţiunea unor enzime, numite *enzime de activare a aminoacizilor*, (aminoacil – ARNt sintetaze), fiecare din aceste enzime având o înaltă specificitate pentru un anumit aminoacid şi pentru ARNt-ul său. Reacţia enzimatică de activare este:

$$\text{Aminoacid} + \text{ARNt} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{aminoacil–ARNt} + \text{AMP} + \text{PPa}$$

La reacţia de activare, are loc hidroliza ATP şi formarea AMP şi pirofosfat. Transferul unui aminoacid pe ARNt-ul specific are loc în trei etape:

1) În prima etapă, *activarea,* ATP reacţionează cu aminoacidul, are loc punerea în libertate a pirofosfatului şi formarea unui intermediar legat de enzimă, *aminoacil-acid adenilic* (fig. 10.1.) (2). La acest intermediar, gruparea carboxil a aminoacidului este legată, printr-o legătură de tip anhidridă, de gruparea 5'–fosfat din AMP.

Aminoacil-ARNt sintetazele au o mare specificitate atât pentru aminoacid, cât şi pentru ARNt corespunzător. Pentru fiecare aminoacid, există mai mult de un ARNt.

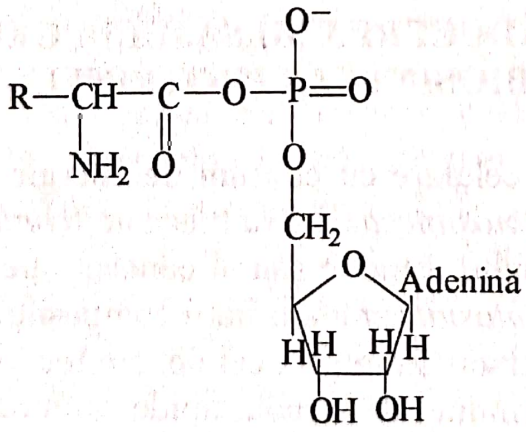


Fig. 10.1. Structura generală a aminoacil – adenilaţilor (2)

2) În a doua etapă, gruparea aminoacil este transferată de pe AMP la capătul 3' al ARNt, urmată de eliberarea aminoacil-ARNt şi acid adenilic:

$$\text{Aminoacil-acid adenilic} + \text{ARNt} \leftrightarrow \text{aminoacil-ARNt} + \text{acid adenilic}$$

Scanned with OKEN Scanner

În etapa a doua, numită de *inițiere*, ARNm purtător al informației genetice, care specifică secvența de aminoacizi și pe primul său aminoacil-ARNt de inițiere sunt legați de subunitatea mică (30S) a ribozomului, un proces care necesită prezența a trei proteine specifice numite factori de inițiere (FI–1, F–2, FI–3), cât și GTP (guanozin 5'–trifosfat) și Mg^{2+}. Subunitatea mare (50S) a ribozomului se leagă, apoi, de acest complex pentru a forma ribozomul funcțional (70 S).

Lanțurile polipeptidice sunt construite începând cu restul de aminoacid N–terminal. Noi resturi de aminoacil sunt adăugate la gruparea carboxil C– terminală a peptidil–ARNt printr-o deplasare nucleofilă a ARNt din legătura sa esterică cu atomul de carbon carboxilic al aminoacilului.

La *Escherichia coli*, aminoacidul de inițiere este N–formilmetionina care intră ca N–formilmetionil–ARNt.

N–formilmetionil–ARNt și ARNm se leagă de subunitatea 30 S a ribozomului, pentru a forma complexul de inițiere, proces care necesită prezența GTP și a celor trei factori de inițiere FI–1, FI–2, FI–3. Subunitatea 30 S se leagă de ARNm pe un loc specific, situat la circa 10 nucleotide de capătul 5' al ARNm. Formilmetionil–ARNt se leagă de complex, recunoscând codonul AUG sau GUG de la ARNm. Complexul de inițiere se combină apoi cu subunitatea 50 S pentru a forma ribozomul funcțional 70 S, în care formilmetionil – ARNt ocupă locul peptidil (P) din ribozom (fig. 10.2).

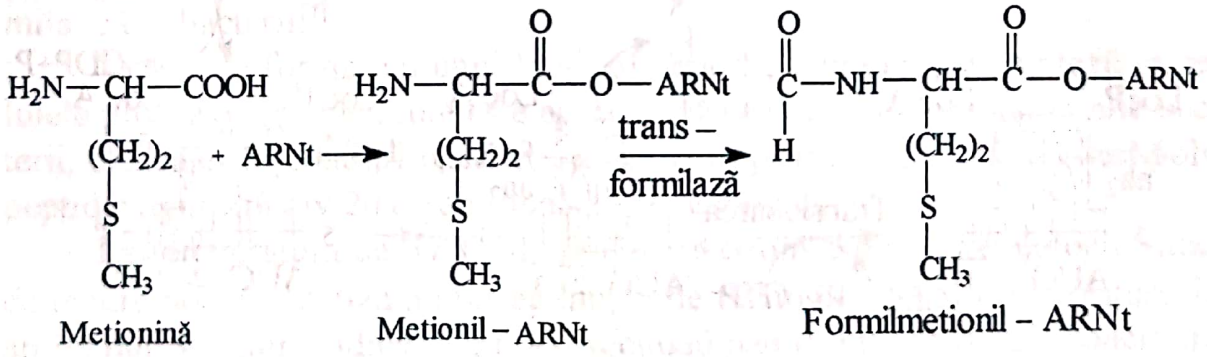


Fig. 10.2. Formarea formilmetionil – ARNt

În ribozomi, mai există un al doilea loc adiacent numit aminoacil (A), care, în complexul de inițiere, este gol (fig. 10.3.) (4).

3) În etapa a treia, *alungirea* sau *elongația*, lanțul polipeptidic este mărit prin adăugarea secvențială a noi resturi de aminoacil transferați enzimatic de pe esterii aminoacil – ARNt, fiecare dintre ei fiind legați de ribozom

ca răspuns la un codon specific sau triplet de baze pirimidinice sau purinice din molecula de ARNm.

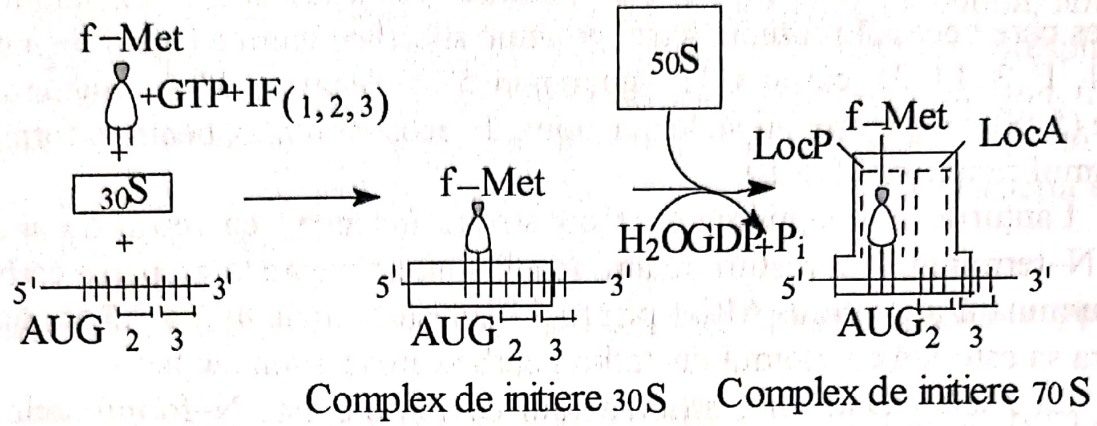


Fig. 10.3. Faza de inițiere a sintezei lanțului polipeptidic la procariote (4)

Formarea unei legături peptidice are loc prin transferul formamil-metioninei de pe locul P, pe gruparea amino din aminoacil–ARNt de pe locul A, reacție catalizată de o peptidiltransferază (fig. 10.4) (4).

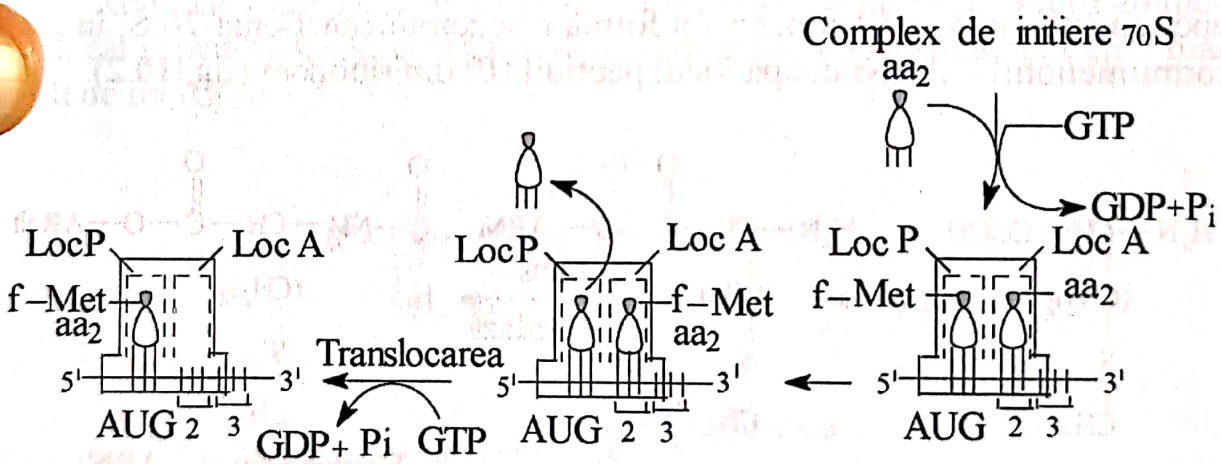


Fig. 10.4. Faza de elongație la sinteza lanțului polipeptidic la procariote (4)

În urma formării legăturii peptidice pe locul A, pe locul P, rămâne un ARNt liber şi pe locul A, un dipeptidil–ARNt. Urmează perioada de translocare în care, ARNt liber părăseşte locul P, iar dipeptidil–ARNt se mută de pe locul A pe locul P, concomitent cu deplasarea ARNm cu trei nucleotide spre capătul 3'. În acest fel, codonul următor de pe ARNm este pregătit a fi citit de către anticodonul unui aminoacil – ARNt corespunzător.

Scanned with OKEN Scanner

În procesul de elongaţie, intervin doi factori de elongaţie de natură proteică, FE – T, FE–G şi hidroliza GTP.

După translocare, ciclul elongării se repetă, deoarece pe locul A se inserează un alt aminoacil–ARNt, cel care urmează în secvenţa lanţului polipeptidic şi este specificat de codonul din ARNm aflat în locul A. Astfel, mesajul genetic, reprezentat de codonii din ARNm, este citit de anticodonii din ARNt şi tradus în formarea legăturilor peptidice între aminoacizii din secvenţa specificată de gena copiată de pe ADN de către ARNm (4).

În etapa a patra a sintezei proteice, numită de *terminare*, în momentul în care lanţul polipeptidic este completat, care corespunde cu momentul atingerii codonului de terminare din ARNm, polipeptidil–ARNt este eliberat din legătura sa cu ARNt şi cu ribozomul, prin acţiunea factorilor de desprindere R_1 şi R_2, care sunt nişte proteine specifice.

Lanţul polipeptidic, în timpul sintezei sale, atât în celulele procariote cât şi eucariote, se formează începând cu aminoacidul amino–terminal, a cărui grupare carboxil formează o legătură peptidică cu gruparea amino a aminoacidului următor din lanţ. Adăugarea de noi resturi de aminoacizi la capătul liber carboxil–terminal al lanţului polipeptidic în creştere continuă până când lanţul este complet (2).

La eucariote, majoritatea proteinelor sunt sintetizate în ribozomii 80 S din citosol, care sunt formaţi din subunităţile 40 S şi 60 S. La eucariote, iniţierea sintezei lanţului peptidic are loc prin metionil–ARNt, care nu este formilat ca la bacterii.

Viteza de formare a unui lanţ polipeptidic complet prin sinteză în celulele procariote şi eucariote este apreciabilă. Astfel, în *E. coli* şi în alte bacterii, crescând în condiţii optime, un ribozom poate insera într-un lanţ polipeptidic aproximativ 20 de aminoacizi pe secundă.

La temperatura de 37°C, un singur ribozom dintr-un reticulocit intact de iepure poate sintetiza un întreg lanţ α de hemoglobină (146 de resturi) în aproximativ 3 min., adică în circa o secundă pentru un rest de aminoacid încorporat (2).

Gruparea N–formil a restului de metionină nu apare în proteina finită a procariotelor, deoarece este îndepărtată de o deformilază. Restul metionil de iniţiere a unor polipeptide poate fi îndepărtat de către o metionin–aminopeptidază.

Legăturile disulfidice transversale dintre lanţuri se formează pe cale enzimatică, după ce lanţurile polipeptidice au fost deja construite. Informaţia necesară stabilirii corecte a legăturilor transversale în proteine se află în însăşi secvenţa aminoacizilor din lanţul polipeptidic. Alte modificări covalente

Scanned with OKEN Scanner

includ reacţiile de fosforilare, metilare, hidroxilare, cât şi reacţii de fixare a grupărilor proteice.

10.2. INHIBITORI AI SINTEZEI PROTEICE

Cei mai mulţi inhibitori ai sintezei proteice se combină cu una dintre cele două subunităţi ribozomale şi interferă cu o anumită etapă a sintezei. Din clasa antibioticelor, se menţionează: *tetraciclina* (inhibă legarea aminoacil – ARNt la unităţile mici ribozomale), *puromicina* (este similară aminoacil – ARNt şi împiedică transferul peptidelor rezultate în terminalele premature la procariote şi eucariote), *cloramfenicolul* (inhibă peptidil–transferazele la procariote), *ciclohexamida* (inhibă peptidil–transferazele la eucariote), *streptomicina* (inhibă iniţierea lanţului peptidic procariotic, de asemenea, induce citirea greşită de ARNm), *neomicina* (similară în activitate cu streptomicina), *canamicina, eritromicina* (inhibă translocaţia procariotică între unităţile mari de ribozo-mii), iar din rândul altor substanţe toxice: *emetina, toxina difterică, abrina, acidul fusidic* şi *ricina* (fig. 10.5.) (2).

Cloramfenicolul inhibă sinteza proteică pe ribozomul 70 S al celulelor procariote şi al mitocondriilor celulelor eucariote, prin blocarea transferului de peptidil–ARNt, dar nu inhibă sinteza proteică pe ribozomul 80 S al celulelor eucariote. Cloramfenicolul este relativ toxic, deoarece inhibă sinteza proteică în ribozomii mitocondriali.

Ciclohexamida inhibă sinteza proteică pe ribozomul 80 S al eucariotelor, dar nu inhibă în ribozomul 70 S al procariotelor. Ciclohexamida blochează formarea legăturilor peptidice.

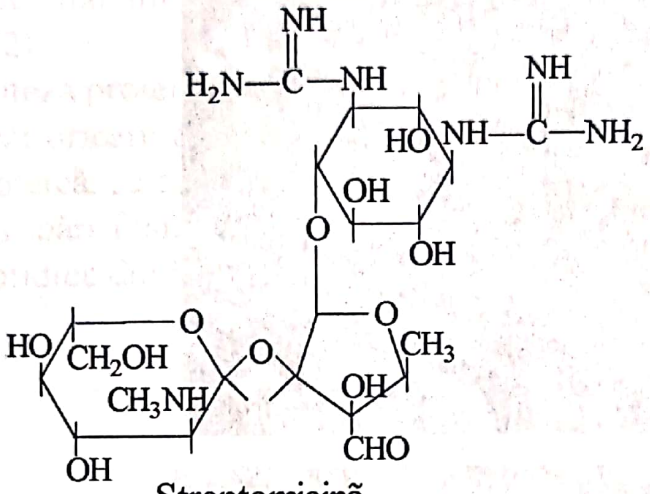
Puromicina inhibă sinteza lanţului polipeptidic, interacţionând pe ribozom cu peptidil–ARNt, formând peptid–puromicină, care se desprinde de pe ribozom.

Streptomicina, neomicina şi canamicina se leagă de subunitatea mică a ribozomilor celulelor procariote. Ele inhibă sinteza proteică şi produc citirea greşită a codonului genetic.

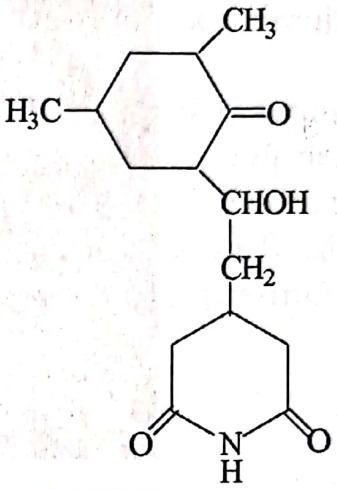
Alcaloidul emetina inhibă legarea aminoacil–ARNt. Toxina difterică, secretată de bacteria difterică, este o enzimă care catalizează reacţia dintre NAD^+ [nicotinamid – adenin dinucleotid (difosfopiridin nucleotid)] şi factorul de elongaţie FE–2 în ribozomii celulelor eucariote, pentru a rezulta un complex inactiv ADP– riboză – FE – 2, ceea ce duce la blocarea translocaţiei (2).

Scanned with OKEN Scanner

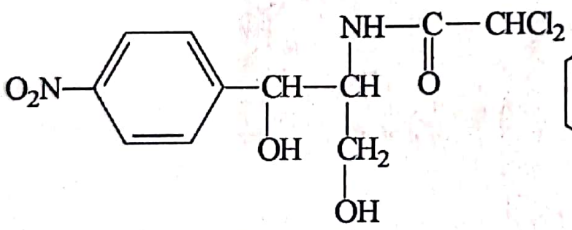
Abrina şi ricina sunt două proteine vegetale toxice, care inhibă sinteza proteică pe ribozomii eucariotelor, prin inactivarea subunităţilor 60 S, blocând astfel elongaţia.



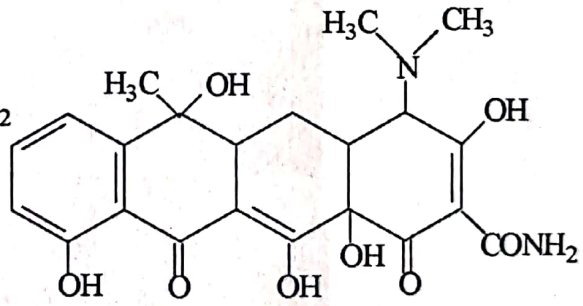
Streptomicinã



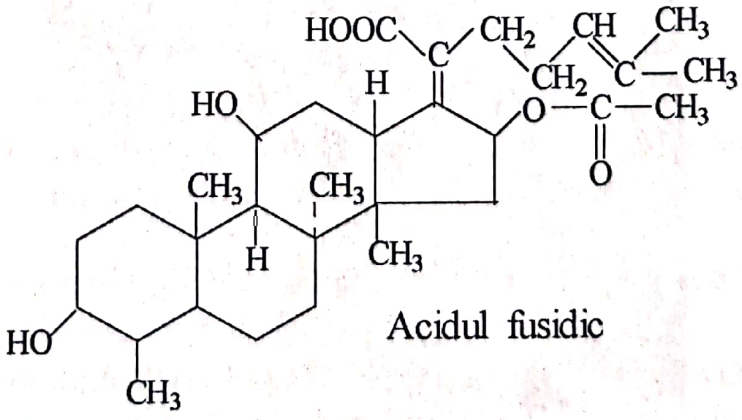
Ciclohexamidã



Cloramfenicol



Tetraciclinã



Acidul fusidic

Fig. 10.5. Inhibitori ai sintezei proteice (2)

Scanned with OKEN Scanner

10.3. POLIRIBOZOMII

Poliribozomii sau *polizomii* sunt grupări de 3 – 4 până la 100 de ribozomi, care pot fi fragmentați până la *monozomi* de către ribonuclează.

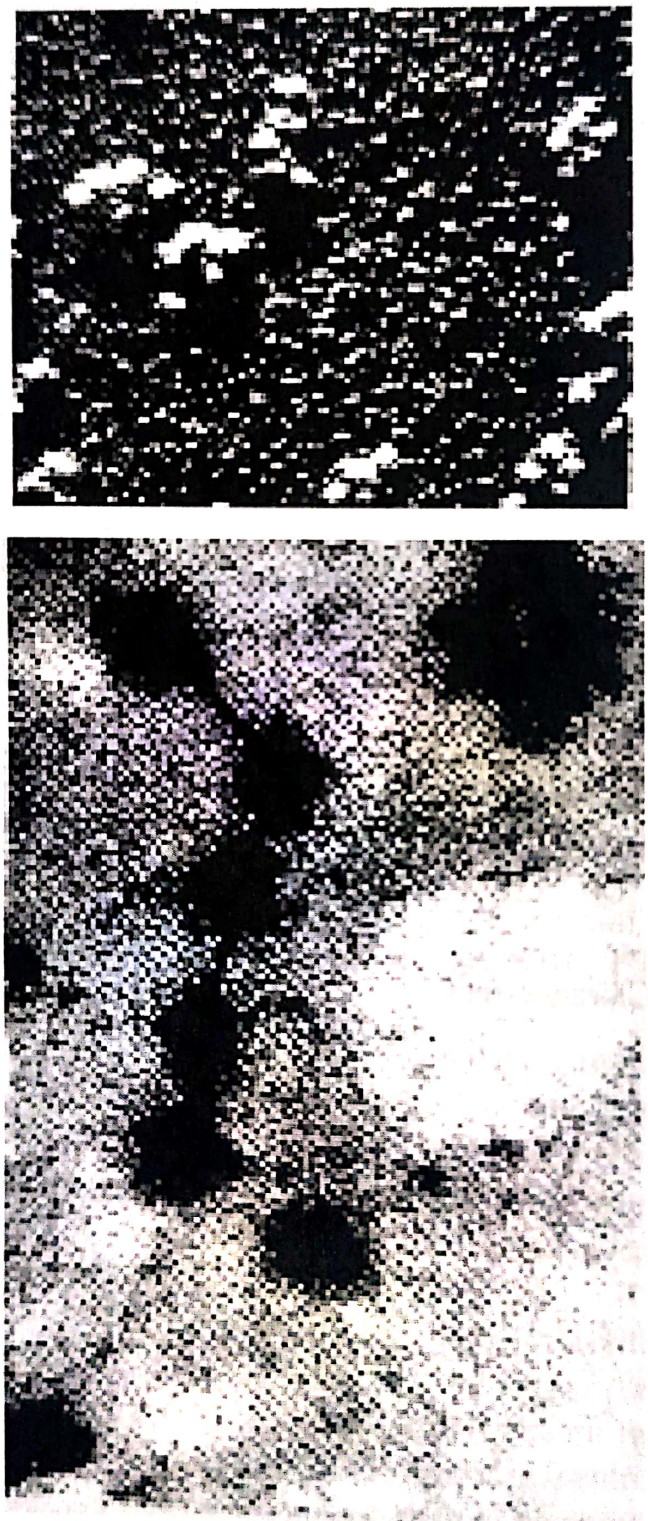


Fig. 10.6. Imagine electronomicroscopică a poliribozomilor din reticulocite care sintetizează lanțurile polipeptidice ale hemoglobinei (A. Rich) (2)

Scanned with OKEN Scanner

Aceasta arată că poliribozomii pot fi ţinuţi împreună de către ARNm (fig. 10.6.) (2). În figura 10.6., se văd ribozomii aşezaţi unii lângă alţii la anumite distanţe şi fibrele de ARNm.

Fiecare ribozom al unui poliribozom poate realiza un lanţ polipeptidic complet. Un astfel de aranjament foloseşte mult mai bine matriţa de ARNm, deoarece mai multe lanţuri polipeptidice pot fi sintetizate simultan (fig. 10.7.) (2).

Sinteza proteică, la cele mai multe organisme, consumă mai multă energie decât oricare alt proces de biosinteză. În celulele de *E. coli* pentru sinteza proteică, se consumă până la 90 % din energia celulară. S-a constatat că patru grupări fosfat macroergice sunt necesare pentru sinteza fiecărei legături peptidice din lanţul polipeptidic complet. Acest lucru reprezintă o forţă

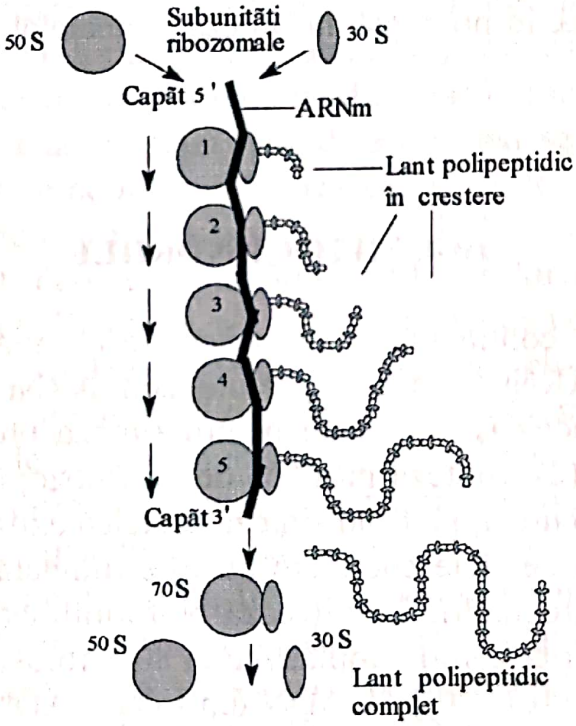


Fig. 10.7. Un polizom. Cinci ribozomi citesc simultan ARNm deplasându-se de la capătul 5' la capătul 3' (2)

termodinamică, cu mult în exces în direcţia sintezei, deoarece sunt investite un total de: –7,3 x 4 = – 29,2 Kcal (7,3 Kcal / mol^{-1} = $\Delta G^{0'}$ = variaţia energiei libere standard de hidroliză, la pH = 7, pentru ATP⟶⟶ ADP + P) pentru a genera o legătură peptidică, a cărei energie liberă standard de hidroliză ($\Delta G^{0'}$) este de cel mult – 5,0 Kcal.

Deci $\Delta G^{0'}$ a sintezei legăturii peptidice este în jur de –24,2 Kcal, energie pe seama legăturii fosfat macroergice. Este un proces ireversibil, iar consumul de energie pe care celula trebuie să–l facă asigură fidelitatea în traducerea mesajului genetic al ARNm în secvența de aminoacizi a proteinelor.

Biosinteza lanțurilor polipeptidice pe ribozomii citoplasmatici 80 S din celulele eucariote urmează același model ca al ribozomilor 70 S din bacterii, însă cu unele diferențe de detalii (2).

În celulele eucariote, ribozomii se găsesc liberi în citoplasmă sau legați de reticulul endoplasmatic, iar în celulele procariote, se găsesc liberi în citoplasmă şi, mai ales, sub formă de poliribozomi. Se pare că ribozomii liberi din citoplasma eucariotelor participă, mai ales, la biosinteza proteinelor destinate utilizării intracelulare, pe când ribozomii atașați la reticulul endoplasmatic participă, în principal, la sinteza proteinelor ce vor fi transportate în afara celulei.

10.4. MITOCONDRIILE

Mitocondriile conțin toate componentele esențiale necesare sintezei proteice: ARNm, ARNt, ribozomi şi aminoacil–ARNt sintetaze, toate însă deosebindu-se de aceleaşi elemente pentru sinteza proteică extramitocondrială la eucariote (2). Sinteza proteică de pe ribozomii mitocondriali este inhibată de cloramfenicol, pe când sinteza proteică extramitocondrială de pe ribozomii 80 S din celulele eucariote nu este inhibată de acest antibiotic. Sinteza proteică mitocondrială utilizează N–formilmetionina ca aminoacid de inițiere, pe când ribozomii citoplasmatici 80 S folosesc metionina. În mitocondrii, se găseşte 0,1 – 0,2 % ADN din totalul ADN celular, care diferă de ADN nuclear, prin bazele pirimidinice şi purinice conținute, iar masa sa moleculară este de circa 10 milioane. Mitocondriile conțin şi o ARN polimerază dependentă de ADN care este inhibată de actinomicina D. Mitocondriile sunt capabile de a genera ARNm din ADN-ul lor. Marea majoritate a enzimelor mitocondriale şi proteinele celulare sunt codificate de gene din cromozomii nucleari şi sunt sintetizate pe cromozomii extramitocondriali. ADN mitocondrial codifică ARN–urile ribozomale mitocondriale şi, probabil, cea mai mare parte a ARNt mitocondriale.

Scanned with OKEN Scanner

10.5. CODIFICAREA INFORMAȚIEI GENETICE

Determinarea structurii moleculare a acizilor nucleici şi a rolului lor genetic a condus la ipoteza că informaţia genetică a organismelor se găseşte înregistrată biochimic în aceste molecule, sub forma unor anumite secvenţe de nucleotide.

Experienţele genetice mai vechi au sugerat că fiecare aminoacid este codificat de un număr mic de nucleotide succesive din ADN.

G. Gamov (1955) a emis ipoteza, după care, în macromoleculele acizilor nucleici, se găseşte codificată biochimic informaţia genetică necesară sintezei moleculelor de proteine. Bazându-se pe faptul că în macromoleculele de ADN sunt patru tipuri de nucleotide ce conţin diferite baze pirimidinice şi purinice, adenină (A), timină (T), guanină (G) şi citozină (C), care se pot succede într-un număr foarte mare de moduri, iar în macromolecula proteică, sunt 20 de tipuri de aminoacizi care, de asemenea, se pot succede într-un număr foarte mare de moduri, codificarea celor 20 de tipuri de aminoacizi nu se poate realiza de către un singur nucleotid ($4^1 = 4$) sau de către două nucleotide ($4^2 = 16$), deoarece numărul combinaţiilor este mai mic decât numărul aminoacizilor. De aceea, s-a ajuns la concluzia că numai combinaţii de trei nucleotide ($4^3 = 64$) pot realiza codificarea celor 20 de aminoacizi, deoarece numărul de combinaţii îl depăşeşte pe cel al aminoacizilor.

Macromoleculele de acizi nucleici conţin un număr mare de nucleotide, astfel că, prin modificarea secvenţei acestora, se poate înregistra o mare cantitate de informaţie genetică. În celula mamiferelor, se găsesc 500 000 – 600 000 macromolecule de ADN, fiecare macromoleculă fiind formată din cel puţin 10 000 nucleotide. De aici rezultă că posibilităţile de înregistrare codificată a informaţiei genetice a ADN din celula mamiferelor sunt foarte mări.

Informaţia genetică este codificată în ADN sau, în cazul unor virusuri, în ARN, sub forma unei secvenţe de trei nucleotide, *cuvinte de cod* sau *codoni*. Prin procesul de transcripţie, informaţia genetică este transferată la ARNm şi apoi, prin translaţie, este transformată într-o secvenţă de 20 de tipuri de aminoacizi în catena polipeptidică.

Pe baza cercetărilor întreprinse de M. Nirenberg, H. Matthaei, H.G. Khorona şi S. Ochoa, în anul 1965, s-a reuşit identificarea tuturor cuvintelor de cod (*codonilor*) a aminoacizilor, în sensul că sunt cunoscute toate tripletele de nucleotide (codonii) din ARNm ce codifică diferiţii aminoacizi. Aceşti codoni sunt formaţi din patru tipuri diferite de nucleotide ce conţin bazele pirimidinice şi purinice, adenină (A), uracil (U), guanină (G) şi citozină (C).

Scanned with OKEN Scanner

Adevăratul cod genetic conţinut în macromolecula de AND poate fi uşor cunoscut prin înlocuirea nucleotidelor din ARNm cu complementul lor, şi anume: citozina (C) prin guanină (G), guanina (G) prin citozină (C), adenina (A) prin timină (T) şi uracilul (U) prin adenină (A).

În total, există un număr de 64 de codoni, dintre care numai 61 corespund diferiţilor aminoacizi (fig. 10.8.).

Codonii *ocru* şi *ambră* (UAA şi UAG) nu corespund nici unui aminoacid, ei indicând sfârşitul catenei polipeptidice în curs de sinteză.

Codonul azur (UGA) nu codifică nici un aminoacid (codon nonsens sau stop), el având rolul de a separa genele în cadrul unui mesaj genetic policistronic.

Codonii AUG şi GUG marchează începutul unei catene polipeptidice, în care este încorporată formilmetionina [cel puţin la *Escherichia coli* (5)].

Codul genetic (fig. 10.8.) are patru caracteristici importante:

1) Pentru a indica capătul unui codon sau începutul următorului, nu este necesar nici un semn de punctuaţie. De aceea, cadrul de citire trebuie aşezat corect la începutul moleculei de ARNm şi apoi deplasat secvenţial de la un triplet la altul, altfel toţi codonii ar fi defazaţi, rezultând o proteină cu o secvenţă de aminoacizi eronată. Acest fapt presupune necesitatea existenţei în ARNm a unei forme de semnal unic care să indice punctul corect de începere a citirii de către ribozomi.

2) Codul aminoacizilor este degenerat, ceea ce înseamnă că există mai mult de un cuvânt de cod (codon) pentru cei mai mulţi dintre aminoacizi. Caracterul degenerat al codului nu este uniform. Astfel, codul pentru arginină, leucină şi serină este degenerat de şase ori pentru fiecare aminoacid menţionat, în timp ce codul pentru alţi aminoacizi: alanina glicina, prolina, tirozina şi valina este degenerat de patru ori etc. (tabelul 10.1.).

3) Aşa cum se observă din tabelul 10.1., acolo unde numărul codonilor pentru un aminoacid este mai mare de unu, primele două litere dintr-un codon, pentru un aminoacid, sunt aceleaşi, diferenţierile făcându-se la a treia bază, care este mai puţin specifică. Nu respectă această regulă arginina, leucina şi serina la care sunt diferenţieri şi la prima bază. Este ştiut că primele două litere din fiecare codon sunt determinanţii principali ai specificităţii. A treia poziţie, oscilantă şi labilă, conţine nucleotidul de la capătul 3' din codon (F. H. Crick) (2).

4) Dintre cele 64 de triplete ale codului genetic, trei nu codifică nici un aminoacid (UAG, UAA şi UGA), aşa cum s-a arătat mai sus.

În cazuri rare, nu ADN serveşte drept matriţă pentru sinteza ARN, ci invers. H.M. Temin a dovedit că unele virusuri sunt capabile să determine sinteza unui ADN care este integrat în cromozomii celulei gazdă şi provoacă

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 10.1.

Caracterul degenerat al codului aminoacizilor

Amino-acidul	Numărul de codoni	Codonii	Amino-acidul	Numărul de codoni	Codonii
Trp	1	UGG	Tyr	2	UAU, UAC
Met	1	AUG	Ile	3	AUU, AUC, AUA
Asn	2	AAU, AAC	Ala	4	GCU, GCC, GCA, GAG
Asp	2	GAU, GAC	Gly	4	GGU, GGC,GGA, GGG
Cys	2	UGU, UGC	Pro	4	CCU, CCC, CCA, CCG
Gln	2	CAA, CAG	Thr	4	ACU, ACC, ACA, ACG
Glu	2	GAA, GAG	Val	4	GUU, GUC, GUA, GUG
His	2	CAU, CAC	Arg	6	CGU,CGC,CGA,CGG,AGA, AGG
Lys	2	AAA, AA	Leu	6	UUA,UUG,CUU,CUC;CUA;CUG
Phe	2	UUU, UUC	Ser	6	UCU,UCC,UCA,UCG,AGU,AGC

Figura 10.8. Codul genetic (ARN) sau Dicţionarul cuvintelor de cod

Primul nucleotid al codonului(5′)	Al doilea nucleoid al codonului				Al treilea nucleotid al codonului (3’)
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA ocru	UGA azur	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG ambră	UGG Trp	G

C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GGA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

transformarea sa malignă (5). De exemplu, virusul care provoacă sarcomul aviar necesită, pentru replicarea sa, ADN. S-a dovedit că ARN viral este complementar cu o regiune a ADN celular. Aceasta înseamnă că ARN viral acționează ca matriță pentru ADN. În aceste cazuri, transferul de informație se realizează în sensul ARN → ADN (5).

Cuvintele de cod prezentate în figura 10.8. sunt considerate, în prezent, din punct de vedere biologic, ca universale. Ele sunt identice la *E. Coli*, virusul mozaicului tutunului, la om şi alte vertebrate şi la un număr mare de bacteriofagi.

10.5.1. ORIGINEA ŞI EVOLUȚIA CODULUI GENETIC

Apariția materialului genetic a avut loc în mai multe etape, care coincid cu apariția vieții pe Pământ.

Se presupune că Pământul s-a format acum 4 800 milioane de ani, prin condensarea unui nor de gaze şi praf, mai ales din elemente radioactive care, prin descompunerea lor în interiorul Pământului, au generat multă căldură şi activități vulcanice.

Scanned with OKEN Scanner

Atmosfera străveche, cu aproximativ 4 000 milioane de ani în urmă, care provenea parţial din interiorul Pământului, conţinea, probabil, mult azot, era bogată în hidrogen, metan, amoniac şi apă. Este foarte posibil ca în perioada apariţiei vieţii, atmosfera să fi fost puternic reducătoare şi total lipsită de oxigen. Oxigenul a apărut mult mai târziu, în mare parte, ca produs al biosintezei. Concentraţia oxigenului atmosferic a atins procentul de 1 % abia acum 600 – 1 000 milioane de ani şi de 10 %, acum 400 milioane de ani.

Numeroase date susţin că o serie de compuşi organici au provenit, la început, din reacţiile dintre diferiţii compuşi anorganici, sub influenţa radiaţiilor solare, a razelor ultraviolete, a descărcărilor electrice, a variaţiilor de temperatură etc. În această perioadă, au apărut biomoleculele primordiale (30 – 40 de tipuri) împreună cu alţi compuşi organici: aminoacizi, baze azotate, acizi organici, zaharuri. Aceşti compuşi organici s-au acumulat treptat în marea primitivă. Această perioadă veche, numită *perioada de evoluţie chimică*, a durat cam 1 500 milioane de ani, adică aproximativ o treime din istoria Pământului. Mai târziu, în această perioadă, astfel de molecule organice au suferit condensări abiotice, formând polipeptide primitive, polinucleotide, polizaharide şi lipide. Din amestecul de molecule organice şi polimeri, acumulat în apele oceanelor, mărilor şi în apele interioare, se presupune că s-au format primele organisme vii. Polipeptidele primitive, protenoidele, au fost substanţe proteice foarte simple, cu o greutate moleculară de până la 10 000 şi care manifestau chiar unele activităţi catalitice.

Într-o etapă următoare, a avut loc sinteza proteinelor şi a polinucleotidelor, mai întâi neenzimatic şi apoi catalizate de enzime. Din interacţiunea acizilor nucleici cu proteinele, s-au format complexe mai stabile. În prezent, materialul genetic se găseşte strâns legat de proteine, iar informaţia genetică este translată în proteine. În cadrul acestui complex de nucleoproteine, acizii nucleici şi-au asumat rolul de matriţă, datorită stabilităţii lor chimice relativ mai mari (5), iar proteinele s-au dovedit a avea o capacitate reactivă mai mare, au avut rol structural şi enzimatic, contribuind substanţial la mărirea complexităţii moleculelor în evoluţie. În timp, a apărut primul organism viu, care, în esenţă, a reprezentat un sistem de proteine, ale căror menţinere şi continuitate au depins de informaţia genetică din acizii nucleici (5).

S-a demonstrat experimental că în atmosfera primitivă a Pământului s-au putut sintetiza adenina şi uracilul şi că din moleculele de amoniac şi acid cianhidric este posibilă sinteza abiogenă a bazelor azotoase purinice şi pirimidinice, care intră în structura acizilor nucleici.

S-a reuşit polimerizarea nucleotidelor în absenţa enzimelor, folosindu-se agenţi care produc dehidrogenarea, în mediu uscat.

Scanned with OKEN Scanner

A. Rich consideră că viaţa a apărut în momentul în care a început sinteza polinucleotidelor cu o anumită secvenţialitate de nucleotide, în conexiune cu sinteza polipeptidelor cu o secvenţă corespunzătoare a aminoacizilor.

Existenţa actuală a două tipuri de acizi nucleici (ADN şi ARN) foarte asemănătoare duce la ipoteza că aceştia au avut un precursor comun. Diferenţierea lor a avut loc, probabil, în cursul evoluţiei, în sensul că ADN mai stabil a devenit material genetic şi ARN, mai puţin stabil, a avut rol în procesul de transcripţie şi translaţie a informaţiei genetice (5).

Codul genetic, până să ajungă la forma actuală, a suferit un proces de evoluţie îndelungat. Iniţial, probabil că tripletele de nucleotide nu aveau o semnificaţie precisă, diferiţi aminoacizi având şanse egale de a fi încorporaţi în catena polipeptidică. Între acest moment şi cel în care o anumită tripletă a determinat încorporarea unui singur aminoacid, au existat, probabil, mai multe momente intermediare.

C.R. Woese susţine că, în procesul de evoluţie a codonului genetic, selecţia a operat asupra celulelor şi nu asupra moleculelor de acizi nucleici. În cursul evoluţiei, au fost selecţionate celulele la care s-a produs limitarea răspunsului la o anumită tripletă şi, ca urmare, a avut loc sinteza anumitor proteine, mai ales a acelor cu rol enzimatic.

Pentru a da o explicaţie experimentală a modului cum a evoluat codul genetic, C.R. Woese a studiat diverse cazuri în care celulele comit erori de translaţie, încorporând un alt aminoacid în locul celui normal, când se sintetizează proteine mutante. Erorile de translaţie pot creşte prin mărirea concentraţiei în ioni de Mg^{2+}, la pH ridicat, la variaţia temperaturii, utilizarea de analogi ai bazelor purinice sau pirimidinice etc.

Astfel, tripleta citozină–adenină–uracil (CAU) codifică histidina, însă din greşeală, poate fi încorporată glutamina care este codificată de tripleta citozină–adenină–adenină (CAA). S-a constatat că poziţia III din tripletă este cel mai frecvent afectată de erori de traducere, ea manifestând gradul maxim de degerescenţă în cod.

Poziţia I din tripleta de nucleotide ocupă locul următor în ceea ce priveşte susceptibilitatea la o citire greşită. În acest caz, se produce încorporarea unui aminoacid înrudit, fără ca această eroare să aibă urmări grave asupra organismului.

Poziţia a II-a din tripleta de nucleotide este cea mai specifică unui codon şi cea mai puţin supusă erorilor de translaţie. O eroare în poziţia II determină o translaţie complet greşită, care va avea urmări grave.

Scanned with OKEN Scanner

Se poate concluziona că ipoteza lui C.R. Woese privind apariţia şi evoluţia codului genetic se bazează pe ideea că mecanismul de translaţie este rezultatul unei evoluţii care se datorează selecţiei.

F.A.C. Crick porneşte de la premiza că, într-o fază mai primitivă, numărul de aminoacizi şi de triplete era mai redus. Mai târziu, încorporarea unui nou aminoacid în proteine şi codificarea sa în cadrul codului genetic s-a realizat numai în măsura în care acestea prezentau un avantaj selectiv. Codul genetic s-a definitivat atunci când numărul şi structura proteinelor au devenit atât de specifice, încât orice adăugare ulterioară de aminoacizi nu mai prezenta nici un avantaj pentru selecţie.

Conţinutul mesajului genetic al organismelor s-a schimbat mereu pe calea recombinării genetice, care s-a realizat prin redistribuirea cromozomilor sau schimbul de material genetic între cromozomii omologi la organismele superioare şi prin recombinarea genelor la cele cu un cromozom, cum sunt bacteriile (5). Prin recombinaţie genetică şi selecţie naturală, se creează o mai bună adaptare la mediu a organismelor. O altă cale de modificare a mesajului genetic o constituie mutaţiile care sunt provocate de accidente la nivelul ADN în cursul replicaţiei sale. Cauzele pot fi fizice (radiaţii, rupturi mecanice în interiorul celulei, nondisjuncţia cromozomilor), chimice (alterarea, substituţia sau eliminarea unor baze purinice sau pirimidinice, alterarea scheletului ADN, intercalarea unor compuşi aromatici oligociclici în ADN) şi enzimatice (erori ale sistemului de replicare, de recombinare, modificarea unor enzime reparatoare ale catenelor ADN).

10.6. PURIFICAREA PROTEINELOR

În vederea folosirii, orice produs chimic şi, mai ales, farmaceutic, natural sau obţinut pe cale de sinteză, este supus unor operaţii ce pot consta din: a. operaţii primare de filtrare, centrifugare, sedimentare sau decantare; b. separări prin extracţie cu solvenţi, adsorbţie, precipitare, ultrafiltrare; c. purificare prin precipitare fracţionată, cromatografie şi cristalizare. De obicei,sunt aplicate grupuri de operaţii variate de purificare.

Extracţia cu solvent, lichid–lichid este o tehnică importantă pentru obţinerea unui mare număr de produse naturale la fermentarea bulioanelor. Exemple de produse care sunt obţinute prin extracţia cu solvent sunt: etanol, acid lactic, acid citric, penicilină G., cefalosporină, streptomicină, vitamina B, riboflavină. Solventul este, astfel, ales pentru a înlesni selectarea şi separarea cât mai bună a produsului în această fază.

Scanned with OKEN Scanner

Extracția cu fluid supercritic. Fluidele, dincolo de temperatura și presiunea lor critică, se numesc *fluide supercritice*. Dioxidul de carbon a fost în cea mai mare măsură utilizat ca fluid supercritic pentru extracție în industria alimentară, dar și în alte sectoare, cum ar fi cel farmaceutic. Costurile acestei tehnici împiedică, însă, extinderea aplicațiilor sale.

Metode bazate pe membrane. Calea de alegere a membranelor este, în principal, criteriul prin care membranele separă moleculele. Pentru moleculele cu diametre în jur de 10Å–1.000Å ultrafiltrarea poate fi folosită pentru concentrare și separare. Membranele compozite produc cele mai bune reținneri. Selecția membranelor are la bază, în primul rând, masa moleculelor ce urmează a fi separate.

Prevaporizarea constă într-o sorbție selectivă a unui lichid într-o membrană, difuzia lichidului prin membrană și conversia sa în fază de vapori pe cealaltă față a membranei, produsă prin aplicarea vacuum-ului. Este un proces intensiv de energie care poate separa lichidele. Selectivitatea, un înalt coeficient de difuzie și rezistența mecanică sunt trei caracteristici ale acestor membrane.

Metodele cromatografice sunt indispensabile pentru izolarea produselor de înaltă puritate. Cromatografia de adsorbție pe silicagel sau alumină (trioxid de aluminiu) s-a practicat de chimiștii organicieni de zeci de ani. Adsorbanții sintetici neionogeni, ca rășinile de polistiren și rășinile de metacrilați se folosesc, de asemenea, pentru variate aplicații. Cromatografia cu schimbători de ioni are aplicații multilaterale.

Practica curentă de purificare a proteinelor se poate divide: metode cromatografice și necromatografice. Metodele cromatografice au o înaltă rezoluție și sunt costisitoare. Tabelul 10.2. cuprinde diferitele metode de cromatografie existente în prezent. Metodele necromatografice (Tabelul 10.3.) nu sunt tot așa de ușor de executat ca metodele cromatografice, sunt mai puțin precise și se realizează la un cost mai scăzut.

Tabelul 10.2.

Diferitele metode cromatografice utilizate

Cromatografia cu schimbători de ioni
Cromatografia pe bază de interacțiuni hidrofobe
Cromatografia cu hidroxiapatită
Cromatografia de afinitate cu metal imobilizat
Cromatografia cu interacțiune tiofilică
Cromatografia de inducție cu încărcare hidrofobă

Scanned with OKEN Scanner

Cromatografia cu procedeu mixt de schimbători de ioni
Cromatografia de afinitate
Cromatografia de substituţie

Tabelul 10.3.

Metode necromatografice

Precipitarea la punctul izoelectric
Precipitarea cu săruri, polimeri, solvenţi organici, surfactanţi, ioni metalici
Separarea a două faze apoase
Trei faze de separare
Cristalizarea
Ultrafiltrarea

În ultimul timp, s-au făcut eforturi de reducere a numărului de procese pentru purificarea proteinelor. Cele mai multe se bazează pe înalta selectivitate a afinităţii unor liganzi la legarea moleculelor proteice.

Cromatografia în strat expandat permite procesarea directă a suspensiilor brute. Aceasta utilizează un strat fluidizat, dar proprietăţile hidrodinamice ale mediului cromatografic sunt asemenea unui strat compact. Materialele suspendate trec prin spaţiile dintre particule şi proteinele pot fi captate din mediu. Cromatografia în strat expandat poate fi realizată pe calea cromatografiei cu schimbători de ioni, a cromatografiei cu interacţiune hidrofobă sau a cromatografiei de afinitate. Avantajele cromatografiei în strat expandat sunt: valoarea de tulburare, purificarea tehnică se combină cu clarificarea şi concentrarea.

Cromatografia de afinitate a ionilor metalici imobilizaţi. Această metodă cromatografică foloseşte afinitatea ionilor metalici ca: Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}, faţă de resturile de histidină, triptofa, fenilalanină, tirozină prezente la suprafaţa proteinelor. Poziţia acestor resturi şi alte proprietăţi ale suprafeţei proteinelor contribuie, de asemenea, la regimul de reţinere a proteinelor în coloana cromatografică. Ionul metalic este coordinat la ligandul chelatic (doi din cei mai folosiţi liganzi sunt acidul iminodiacetic şi acidul nitrolotriacetic), care este legat la un suport uzual (agaroza este cea mai folosită).

Afinitatea la precipitare. Această tehnică se bazează pe faptul că unii polimeri solubili în apă pot fi conjugaţi la o afinitate adecvată a ligandului.

Scanned with OKEN Scanner

Complexul de afinitate format poate precipita din soluție. Proteina poate fi recuperată din acest complex de afinitate, folosind cromatografia de afinitate.

Afinitatea ligandului facilitează trei faze de repartiție. Acestea reprezintă o altă tehnică de precipitare care exploatează sinergetic o sare și un solvent organic la precipitarea proteinelor. Adăugarea sulfatului de amoniu și t-butanol la o proteină creează trei faze: o fază în partea superioară bogată în t-butanol, o fază apoasă inferioară și un precipitat interfacial proteic. Precipitarea în trei faze a fost, în mare măsură, folosită pentru purificarea unui mare număr de proteine.

Separări pe bază de membrană. Îndepărtarea substanțelor cu moleculă mică din soluțiile proteice sau din suspensii prin dializă este cel mai obișnuit și vechi exemplu de folosire a membranelor pentru purificarea proteinelor. Microfiltrarea efectuată la presiunea de 0,1 – 1,0 bari reține particule cu mărimea de 0,1 – 10 μm și este folositoare, de exemplu, la îndepărtarea resturilor celulare din proba de proteină. Ultrafiltrarea la presiune ridicată, de 0,5 – 10 bari poate separa proteinele între ele.

Bibliografie selectivă:

1. Lehninger, A.L., *Biochimie*, vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1987, 1992.
2. Nenițescu, C.D., *Chimie Organică*, Vol. I și II, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1988.
3. Diculescu, I., Onicescu, D., Benga, Gh., Popescu, L.M., *Biologie Celulară*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1983.
4. Ceapoiu, N., *Genetica și Evoluția Populațiilor Biologice*, Editura Academiei Române, București, 1976.
5. Ionescu – Varo, M., *Biologie celulară*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1976.
6. Lehninger, A.L., *Biochemie*. 3. Auflage. Springer-Lehrbuch, Berlin, 2001.
7. Donald Voet et al., *Lehrbuch der Biochimie*, Wley – VCH, 2002.
8. Berg, J.M., Stryer, *Biochemie*, 5 Auflage, Spektrum Akademisher Verlag, 2003.
9. Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger, A.L., *Principles of Biochemistry*, 4th Edition, Palgrave Macmillan, 2004.
10. Christen, Ph., Jaussi, R., *Biochemie*, Eine Einführung mit 40 Lernei-hei-ten, Springer – Verlag, 2005.

Scanned with OKEN Scanner

11. Karlson, P., *KurzesLehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14 Auflage, Thieme, Stuttgart, 2005.

12. Horn F. Et al., *Biochemie des Menschen – Das Lehrbuch für dar Medizinstudium*, 3., vollst. Überarb. U. Erw. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2005.

13. Graeme, K., Hunter, *Vital Forces, The discovery of the molecular basis of life*, Academic Press, London, 2000.

14. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., *Biochemie*, Georg Thieme Verlag, 2006.

15. Raicu, P., Ionescu-Varo, M., Gancevici, G., Moisescu, G., *Celula*, Editura Academiei, Bucureşti, 1972.

16. Campbell, N.A., Reece, J.B., *Biologie*, traduit par Mathieu R., Ed. Editions du Renouveau Pédagogique Inc., Saint Laurent (Québec), 2004.

17. Ogle, J.M., Broderson, D.E., Clemons, W.M., Tarry, M.J., Carter, A.P., Ramakrishnan, V., *Science*, 2001, 292(5518), pp. 897 – 902.

18. Khalyfa, A., Bourbeau, D., Chen, E., Petroulakis, E., Pan, J., Xu, S., Wang, E., *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (25), pp. 22915 – 22922.

19. Verrall, M., (ed), *Downstream Processing of Natural Products*, Chichester, John Wiley, 1996.

20. Thornton, J.D., (ed.), *Science and Practice of Liquid–liquid Extraction*, Oxford, Oxford University Press, 1992.

21. Mc Gray, K.P., Kaplan, D.L., *Protein–based materials*, Boston, Birkhänser, 1997.

22. Bailey, J.E., Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, Singapore, McGraw-Hill, 1986.

23. Lutz, H., Raghunath, B., *Ultrafiltration process design and implementation*, in: Shukla, A.A., Etzel, M.R., Gadam, S. (eds), *Process Scale Bioseparation for the Biopharmaceutical industry*, Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 297 – 332, 2007.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 11

PROTEINE

11.1. Considerații generale 374
11.2. Fundamentul structurii proteinelor 380
11.3. Structura proteinelor 385
11.4. Funcțiile biologice ale proteinelor 393
11.5. Denaturarea proteinelor 394
11.6. Stabilitatea și funcțiile proteinelor 395
11.7. Proteine mai importante 398
11.7.1. Proteine solubile 398
11.7.2. Proteine insolubile 402
11.7.3. Proteide 404
11.8. Separarea, purificarea și caracterizarea proteinelor 407
11.8.1. Considerații generale 407
11.8.2. Separarea proteinelor din amestecuri 410
11.8.3. Extracția și purificarea proteinelor 413
11.8.4. Caracterizarea moleculelor de proteine 413
Bibliografie *413*

11.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Proteinele sunt produși cu structură macromoleculară de natură polipeptidică care, prin hidroliză, conduc la amestecuri de α-aminoacizi. În constituția proteinelor naturale, intră un număr de circa 30 de aminoacizi, dintre care, în mod obișnuit, 20 sunt considerați a fi fundamentali, aceiași la toate formele de viață, de la bacterii și până la om. Prin legarea aminoacizilor în lanțuri polipeptidice, variate ca lungime și ca succesiune a unităților,

se realizează un număr extrem de mare de combinaţii. Socotind că există peste 1,5 milioane de specii de organisme vii, se poate aprecia că acestea au împreună 10^{10}–10^{12} diferite tipuri de proteine, care, după compoziţia lor în aminoacizi, pot fi considerate ca substanţe organice de o mare simplitate.

Proteinele reprezintă circa 50 %, de obicei, mai mult, din masa uscată a celulelor. Acestea se găsesc în orice parte a oricărei celule, deoarece sunt esenţiale pentru toate aspectele structurii şi funcţiilor celulare. Există diferite tipuri de proteine, fiecare specializată pentru o anumită funcţie biologică. De asemenea, cea mai mare parte a informaţiei genetice este exprimată prin proteine. Structura moleculelor proteice şi relaţia acestora cu funcţia lor biologică şi cu activitatea lor sunt probleme de mare însemnătate pentru biochimie (3).

Proteinele sunt componentele esenţiale alături de apă, săruri anorganice, lipide, hidraţi de carbon, acizi nucleici, vitamine şi enzime etc., ale materialelor lichide şi gelificate din celule, în care au loc interacţiuni fizico-chimice intense, cuprinse sub denumirea de *viaţă*.

Proteinele se deosebesc de celelalte componente ale celulelor prin proprietăţi unice, îndeplinind funcţii fundamentale, specifice organismelor vii, cum sunt:

– rol structural major, constituind materialul din care sunt construite toate structurile celulare, membrane, organite celulare, ca şi materialul intercelular al ţesuturilor şi organelor;

– substanţa contractilă a fibrelor musculare, cilii şi flagelurile organismelor inferioare, care posedă capacitatea remarcabilă de a transforma energia chimică în energie mecanică;

– enzimele exercită acţiunile catalitice ale reacţiilor biochimice;

– îndeplinesc funcţii de transport şi de stocare a ionilor metalici, vitamine, oxigen etc.;

– codificarea, conservarea şi duplicarea informaţiei genetice etc.

Proteinele care asigură aceste funcţiuni se bucură de o proprietate neîntâlnită la alte combinaţii: specificitatea.

Proteinele sunt macromolecule informaţionale, cu secvenţe specifice de aminoacizi, sunt expresia epigenetică a genomului celular.

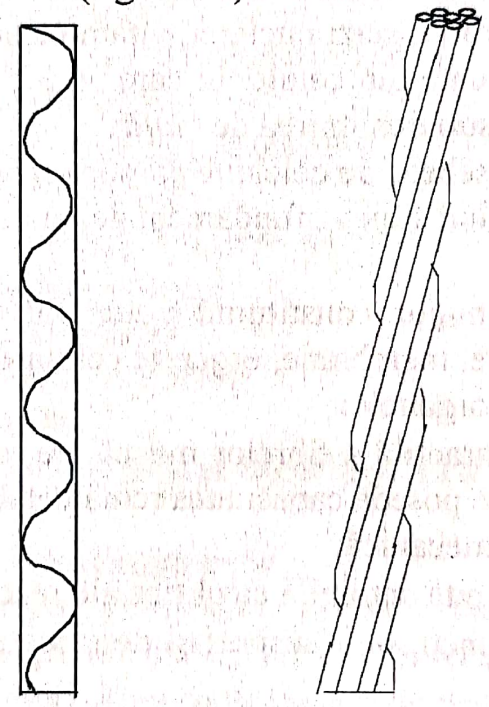
Proteinele diferitelor specii de animale şi vegetale sunt tipice pentru aceste specii, deosebindu-se de cele ale altor specii. Uneori, se observă deosebiri chiar între proteinele indivizilor aceleiaşi specii, ceea ce face ca numărul compuşilor proteici naturali să fie extrem de mare. De aceea, sistematizarea proteinelor este greu de realizat şi adesea este arbitrară, bazându-se pe unele caracteristici şi ignorându-le pe altele.

Scanned with OKEN Scanner

Din clasa proteinelor simple sau a holoproteinelor, se disting pe baza solubilității în apă, două categorii: *proteine ușor solubile* (de regulă, proteine intracelulare) și *proteine insolubile* (uzual, extracelulare, cu roluri de susținere).

Proteinele insolubile în apă, numite *scleroproteine* sau *proteine fibroase*, se găsesc în organismul animal în stare solidă și au rolul de a conferi organelor rezistență mecanică. Astfel de proteine sunt: *keratina, colagenul, elastina, reticulina.*

Scleroproteinele se dizolvă în acizi și baze concentrate, când are loc și o degradare a structurii acestora. Proteinele fibrilare sunt formate din lanțuri polipeptidice aranjate paralel, unele față de altele, în jurul unei axe, dând naștere la filamente sau foi (fig. 11.1.).



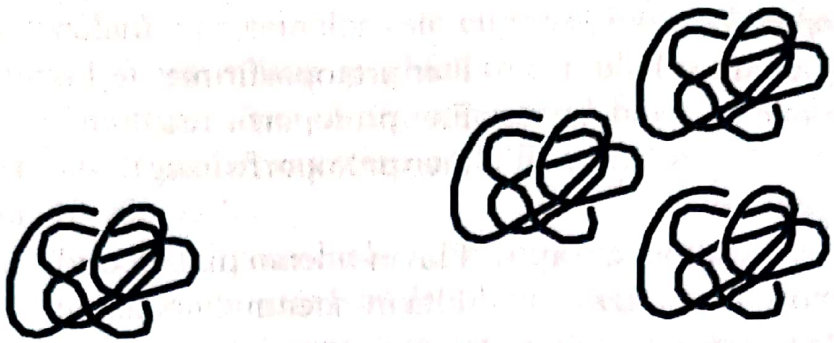
Catenă spiralată de α - helix

Răsucirea α - helixurilor sub formă de funie

Fig. 11.1. Formă de aranjare paralelă a lanțurilor polipeptidice în lungul unei axe, dând naștere la filamente

Proteinele solubile în apă sau *globulare* apar în celule în stare dizolvată sau sub formă de geluri hidratate. În celule, proteinele globulare au o funcție mobilă sau dinamică. Din cele circa 2 000 de enzime cunoscute, aproape toate sunt proteine globulare, de asemenea, anticorpii, unii hormoni și o serie de proteine cu rol de transport, cum sunt *albumina serică* și *hemoglobina*. La proteinele globulare, lanțurile polipeptidice sunt pliate compact în forme sferice sau globulare (fig. 11.2.).

Scanned with OKEN Scanner



Proteină globulară unicatenară

Proteină globulară multicatenară

Fig. 11 2. Lanţuri polipeptidice aranjate în formă globulară compactă în proteinele globulare. Porţiuni scurte din lanţurile polipeptidice pot avea o răsucire regulată în spirală sau structură în zig-zag

Unele proteine pot fi clasificate între proteinele fibrilare şi globulare, cum este cazul, de exemplu, al *miozinei*, o importantă componentă structurală a muşchiului şi a *fibrinogenului*, element structural al cheagului sanguin. Miozina şi fibrinogenul seamănă cu proteinele fibrilare în ceea ce priveşte structura lor şi cu cele globulare, datorită solubilităţii în soluţii apoase saline.

După compoziţia lor chimică, proteinele se împart în două clase principale: *simple* şi *conjugate*. Proteinele simple, la hidroliză, dau aminoacizi şi nici un alt compus organic sau anorganic. Proteidele sau proteinele conjugate, sunt combinaţii ale unei proteine cu o componentă neproteică (*grupare prostetică*).

În funcţie de natura grupării prostetice, se disting următoarele clase de proteine (tabelul 11.1):

Tabelul 11.1. *Grupările prostetice de la unele clase de proteine*

Clasa	Gruparea prostetică:
– *Fosfoproteine*	
Cazeina	Fosfaţi esterificaţi cu radicali de serină;
– *Lipoproteine*	
β_1–Lipoproteine	Fosfolipide, colesterol, lipide neutre ;
– *Glicoproteine*	
γ–Globulina	Hexozamină, galactoză, manoză, acid sialic;
– *Nucleoproteine*	
Ribozomi	ARN

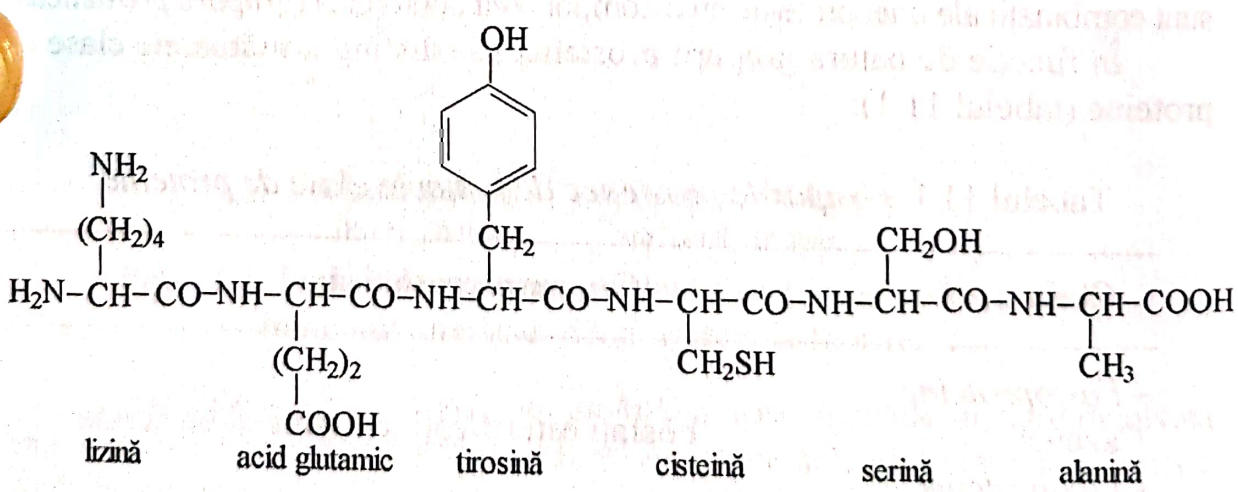
Scanned with OKEN Scanner

– Hemoproteine	
Hemoglobina	Fier protoporfirinic;
Citocrom c	Fier protoporfirinic;
Catalaza	Fier protoporfirinic;
– Flavoproteine	
Succinat dehidrogenaza	Flavin-adenin dinucleotid;
D-aminoacid oxidaza	Flavin-adenin dinucleotid;
– Metaloproteine	
Feritina	$Fe(OH)_3$;
Citocrom c oxidaza	Fe şi Ca;
Alcooldehidrogenaza	Zn;
Xantin oxidaza	Mo şi Fe.

Aceeaşi proteină poate cuprinde mai multe tipuri de grupări prostetice, combinând astfel şi proprietăţile caracteristice ale mai multor clase de proteine conjugate.

Moleculele proteinelor sunt construite din catene polipeptidice lungi, în care resturile de α–aminoacizi sunt unite între ele prin legături amidice (CO–NH).

Catenele polipeptidice sunt constituite din unităţi CH–CO–NH legate cap la cap şi se deosebesc numai prin catenele laterale, R:



Compoziţia elementară a proteinelor este următoarea: 50 – 55 % carbon, 7 % hidrogen, 23 – 25 % oxigen şi 15 – 16 % azot şi 0,3 – 2,0 % sulf. În unele cazuri, se mai găsesc: fosfor, fier, zinc, cupru, iod, brom sau clor.

Scanned with OKEN Scanner

Masa moleculară a proteinelor este cuprinsă între 5 000 (limită inferioară luată arbitrar) şi un milion şi chiar mai mult (exemple: insulina de bovină, 5 700; chimotripsinogenul din pancreasul bovin, 23 200; hemoglobina umană, 64 500; triptofan sintetaza de la E. coli, 159 000; virusul mozaicului tutunului, 40 000 000).

Prin hidroliză acidă, proteinele sunt scindate până la α–aminoacizi, compuşi organici simpli, cu masă moleculară mică. Multe proteine conţin două sau mai multe lanţuri polipeptidice, iar un lanţ polipeptidic conţine 100 – 300 aminoacizi şi mai mult.

Organismul animal asimilează numai aminoacizi liberi, nu şi peptide sau proteine. În timpul digestiei, se produce o hidroliză totală a proteinelor până la aminoacizi, de către enzimele proteolitice din sucurile tubului digestiv. Enzimele proteolitice hidrolizează numai legăturile peptidice dintre α–aminoacizii din seria L. La hidroliză, participă *proteinazele* (*pepsina, tripsina, chimotripsina*) care hidrolizează proteinele native până la peptide şi *peptidazele* (*carboxipeptidaze, aminopeptidaze, dipeptidaze*), care hidrolizează peptidele până la aminoacizi. Gruparea în proteinaze şi peptidaze este îndreptăţită din punct de vedere fiziologic.

Cercetările întreprinse asupra specificităţii enzimelor proteolitice au dus la concluzia că toate sunt, de fapt, peptidaze şi s-a propus împărţirea lor în *endopeptidaze* (corespund proteinazelor), care rup legături peptidice centrale şi dau naştere la peptide mai mici şi *exopeptidaze* (corespund peptidazelor), care rup legăturile peptidice de la marginea catenei şi dau naştere la aminoacizi.

Fiecare enzimă proteolitică hidrolizează preferenţial anumite legături peptidice. Astfel, pepsina hidrolizează legătura peptidică în partea N terminală a fenilalaninei şi tirozinei, tripsina rupe legătura peptidică în partea C terminală a lizinei şi argininei, chimotripsina rupe legătura peptidică în partea C terminală a fenilalaninei şi tirozinei. Carboxipeptidazele desprind câte un aminoacid din partea C terminală a lanţului polipeptidic şi aminopeptidazele scindează câte un aminoacid din partea N terminală a lanţului polipeptidic.

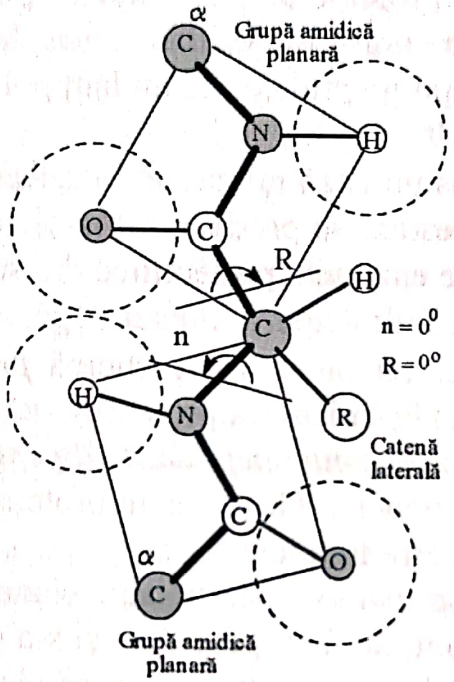
În afară de enzimele proteolitice din secreţiile tubului digestiv, se găsesc asemenea enzime şi în ţesuturile animalelor şi plantelor.

Se menţionează catepsina care contribuie la autoliza *post mortem* a ţesuturilor animale, papaina care a fost izolată din planta Carica papaya şi ficina din smochin (2).

Scanned with OKEN Scanner

11.2. FUNDAMENTUL STRUCTURII PROTEINELOR

Proteinele constau din lanţuri polipeptidice şi diferite grupe laterale. Succesiunea grupelor laterale este codată de acizii nucleici.



La n= φ⁰ şi R= ψ⁰ grupele peptidice sunt coplanare

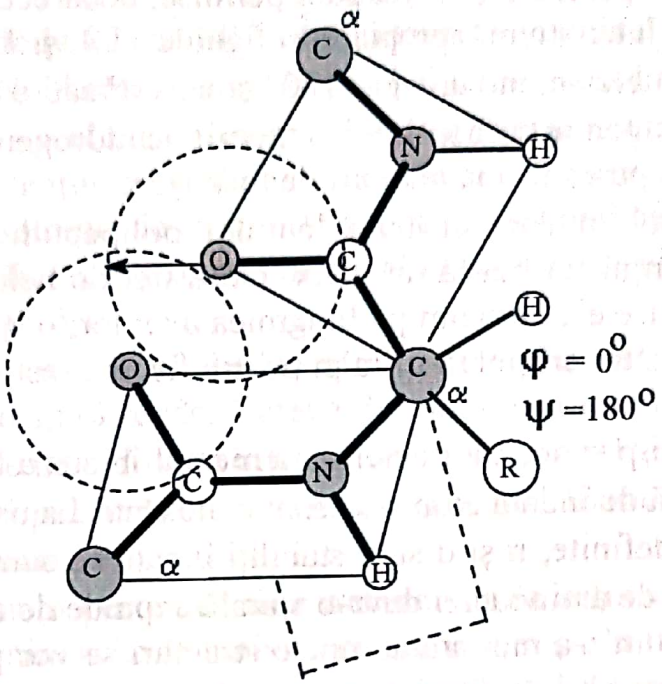
Fig. 11.3. Grupă amidică planară la care $\varphi = 0^0$ şi $\psi = 0^0$

Într-un lanţ polipeptidic care conţine legături peptidice planare, există numai două grade de libertate pentru aminoacizi: rotirea cu un unghi φ în jurul axei legăturii C_α–N şi rotirea cu un unghi ψ în jurul axei legăturii C_α– C.

Rotaţiile φ şi ψ sunt pozitive când ele merg în sensul acelor ceasornicului, văzute din C_α. O înserare a valorilor φ şi ψ pentru toate resturile de aminoacizi conduce la configuraţia exactă a unui lanţ.

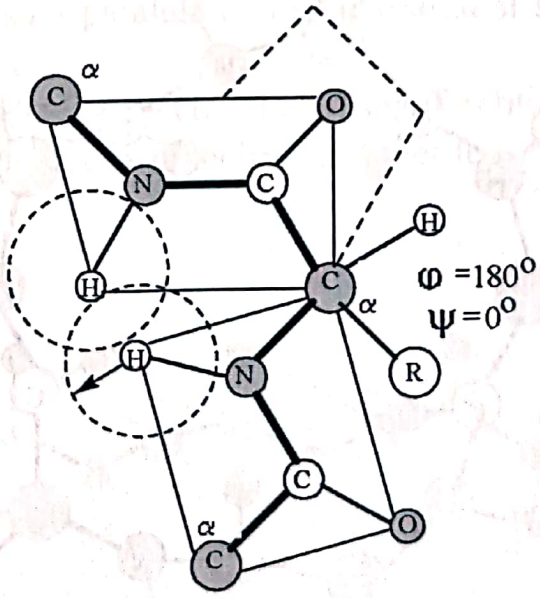
Când $\psi = 0^0$ şi $\varphi = 0^0$ grupele peptidice sunt coplanare (fig. 11.3.).

Scanned with OKEN Scanner



La $\varphi = 0^{\circ}$ şi $\psi = 180^{\circ}$ raza de legătură nu unește împreună atomii de oxigen

Fig. 11.4. Aranjament nepermis când $\varphi = 0°$ şi $\psi = 180°$



La $\varphi = 180^{\circ}$ şi $\psi = 0^{\circ}$ raza de legătură nu unește împreună atomii de oxigen

Fig. 11.5. Aranjament nepermis când $\varphi = 180°$ şi $\psi = 0°$

Scanned with OKEN Scanner

Unele valori pentru φ şi ψ nu sunt permise, deoarece, în aceste cazuri, nu au loc legături între atomii apropiaţi. În figurile 11.4. şi 11.5., sunt exemple de aranjamente interzise, în care φ = 180° şi ψ = 0° sau φ = 0° şi ψ = 180°, când atomii de oxigen ai carbonilului şi atomii de hidrogen de la –NH– sunt în situaţia de a nu putea forma legături de hidrogen.

În momentul în care curbura lanţului polipeptidic la toţi C_α este aceeaşi, atunci lanţul formează un helix. Un astfel de helix este format din spire distanţate între ele cu p nm pe lungimea axei lor; o spiră conţine n resturi de aminoacizi, iar creşterea spiralei pentru fiecare rest de aminoacid este: d = p / n nm.

Valoarea lui p = nd, care determină mersul în sus a helixului, poate fi precis determinată de îndată ce φ şi ψ sunt cunoscuţi. La un lanţ polipeptidic cu dimensiunile definite, n şi d sunt stabiliţi îndată ce sunt determinaţi φ şi ψ. Deci, numărul de aminoacizi dintr-o spirală depinde de φ şi ψ.

Aşa după cum s-a mai arătat, unele structuri se vor putea uşor forma, iar altele sunt imposibil de format, pentru că atomii lor nu pot fi uniţi prin legături chimice, ei fiind prea aproape unii de alţii (1).

Ramachandran şi colaboratorii săi de la Madras au cercetat toate conformaţiile posibile cu ajutorul modelelor şi al computerului.

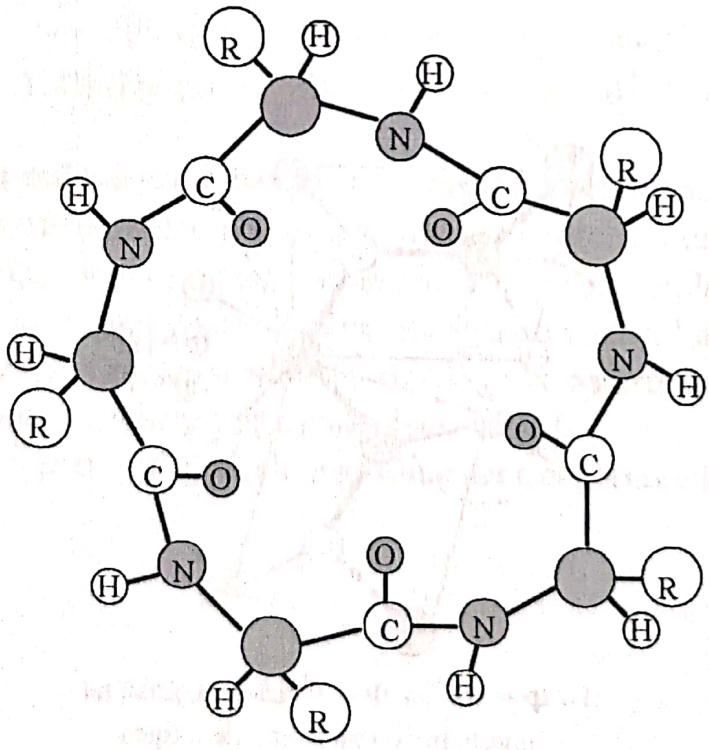


Fig. 11.6. Spirală din cinci resturi de aminoacizi la φ = 120° şi ψ = 86° este cu greu posibilă şi depinde de oxigenii grupelor carbonil (1)

Scanned with OKEN Scanner

Domeniul de la 20^0 la 140^0 este îndeosebi favorizat (1). Se produce o rotire a legăturii N–H către catena laterală şi o mare posibilitate de depărtare a grupei carbonil a aceleiaşi peptide a lanţului lateral. La $\varphi = 120°$ şi $\psi = 86°$ (2), se formează lanţul cu spirale ce conţin cinci resturi de aminoacizi. În această structură, atomii de oxigen ai grupelor carbonil sunt orientaţi înspre partea de mijloc, foarte apropiaţi unii de alţii şi structura ajunge la graniţa de instabilitate (fig. 11.6.).

Dacă ψ se măreşte, se desfac spirele helixului, iar numărul resturilor de aminoacizi din spiră scade. Câteva din aceste structuri au, în special, legături transversale de hidrogen între spirele succesive. Helixul π are 4,4 resturi de aminoacizi pe spiră, iar α–helixul, care este foarte important, are 3,6 resturi de aminoacizi pe spiră.

Creşterea lui ψ peste 86° face trecerea de la helixuri, a căror spire au cinci resturi de aminoacizi la helixuri cu patru, trei şi, în sfârşit, cu două resturi de aminoacizi pe spiră. Scăderea numărului de resturi de aminoacizi pe spiră duce la îngustarea diametrului helixului şi, în acelaşi timp, la creşterea de-a lungul lungimii sale.

α–Helixul cu 3,6 aminoacizi pe spiră are o structură deosebit de stabilă şi se găseşte la un număr mare de proteine. Legăturile transversale de hidrogen ale α–helixului sunt slabe la grupa –NH, în comparaţie cu a π–helixului. Grupele carbonilice sunt paralele cu axa helixului şi se leagă direct cu grupele – NH.

Helixurile 3_{10}–, α– şi π– (fig. 11.7.) se diferenţiază între ele prin legăturile lor de hidrogen, care la α–helix sunt liber tensionate şi, în consecinţă, sunt stabile.

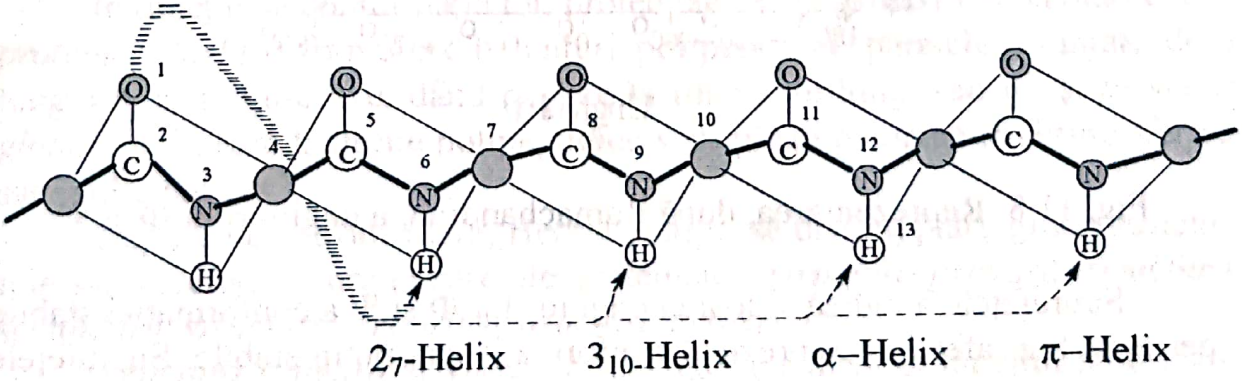


Fig. 11.7. Diferite tipuri de helixuri

Dacă ψ creşte peste 150°, se ajunge la un alt helix stabil, 3_{10}–helix, în care oxigenul carbonilului se află mai aproape de grupa –NH şi formează legături de hidrogen stabile, dar mai slabe decât în α–helix. Grupele carbonilice sunt îndepărtate de la axa helixului şi legăturile transversale de hidrogen sunt, din această cauză, unghiulare. 3_{10}–Helix se găseşte la un număr restrâns de proteine (de exemplu, hemoglobină, lizozimă).

Peste ψ = 180° se înaintează cu dificultate, căci atomii de oxigen ai carbonililor încep să se ciocnească cu atomii de hidrogen amidici din resturile de aminoacizi.

Peste ψ = 234° se ajunge la un domeniu cu noi proprietăţi şi helixul se roteşte la stânga. Aproape de ψ=310° sunt trei aminoacizi pe spiră şi o structură care se găseşte la poliprolină. Această structură cu o înfăşurare de la stânga la dreapta are o proprietate esenţială: grupele carbonil şi grupele amido sunt dispuse aproape perpendicular pe axa helixului şi pot să formeze, într-o mai mare măsură, legături de hidrogen cu grupele aceluiaşi lanţ.

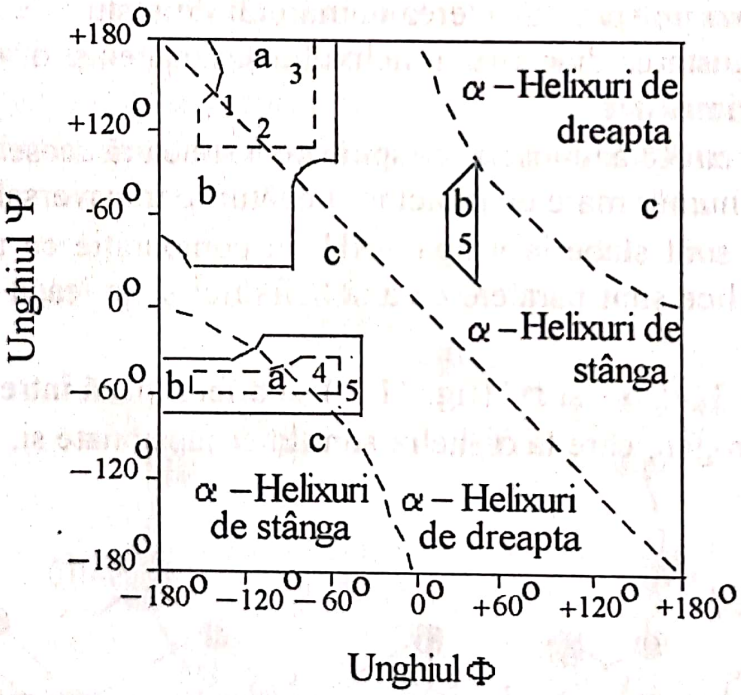


Fig. 11.8. Reprezentarea, după Ramachandran, a unghiurilor Φ şi Ψ

Suprafeţele a indică valoarea unghiurilor Φ şi Ψ a conformaţiei stabile permise. Suprafeţele b reprezintă conformaţii mai puţin stabile. Suprafeţele c corespund unghiurilor Φ şi Ψ nepermise. 1. Structuri β din foi pliate antiparalel. 2. Structuri β paralele. 3. α–Helix de colagen. 4. α–Helix de dreapta. 5. Structuri β paralele.

Scanned with OKEN Scanner

În colagen, se rotesc împreună trei helixuri tip „poliprolină" într-o răsucire de la dreapta la stânga, un helix în jurul altuia, la care una, două sau trei grupe carbonil şi amido formează legături transversale de hidrogen între lanţuri.

Dacă ψ creşte în continuare, creşte numărul de resturi de aminoacizi pe spirală şi helixul se apropie din nou de unul care conţine un pentapeptid pe spirală. La ψ = 350° se ajunge la patru resturi de aminoacizi pe spirală, dar grupele sale carbonilice încep să se împiedice reciproc la axa helixului.

Domeniul de la ψ = 20° până la ψ = 86° este o zonă integral nepermisă şi la ψ = 86° spiralele helixului au din nou cinci resturi de aminoacizi.

G.N. Ramachandran şi colaboratorii au întocmit o diagramă a unghiurilor φ şi ψ, permise şi nepermise ale legăturilor C_α–C şi C_α–N (fig. 11 8.). Numai conformaţiile care cad în suprafeţele a din figura 11.8. sunt stabile şi permise.

11.3. STRUCTURA PROTEINELOR

Fiecare tip de moleculă proteică, în stare naturală, are o formă tridimensională specifică numită *conformaţie.* Conformaţia se referă la aranjarea în spaţiu a grupelor substituente care, datorită rotaţiei în jurul legăturii simple de carbon din moleculă, pot ocupa diferite poziţii, fără ca legătura să se rupă (3). Lanţul polipeptidic al unei proteine are o singură conformaţie în condiţii biologice normale de pH şi temperatură; această conformaţie nativă este destul de stabilă, iar scheletul covalent al lanţului polipeptidic format din legături simple nu se poate roti liber.

În funcţie de conformaţia lor, proteinele se pot grupa în două mari clase: *proteine fibrilare* formate din lanţuri polipeptidice paralele, aranjate de-a lungul unei singure axe, dând naştere la filamente lungi sau foi şi *proteine globulare,* în care lanţurile polipeptidice sunt pliate compact în forme sferice sau globulare.

După Linderström-Lang, Bernal şi alţii, se disting patru grade structurale sau niveluri de organizare ale proteinelor: *structura primară, structura secundară, structura terţiară* şi *structura cuaternară.*

Structura primară se referă la scheletul covalent al lanţului polipeptidic şi la înlănţuirea aminoacizilor în catenele polipeptidice.

Scanned with OKEN Scanner

Structura secundară prezintă aranjamentul unui lanț polipeptidic într-o singură dimensiune în spațiu. Structura secundară este evidentă, în special, la proteinele fibrilare, unde lanțurile polipeptidice prezintă o pliere longitudinală sau extinsă, dar și la fragmente de lanțuri polipeptidice ale proteinelor globulare.

În anul 1951, Pauling și Corey au emis supoziția că modalitatea cea mai probabilă de îndoire sau răsucire a unui lanț poplipeptidic este cea elicoidală, sub forma unei spire lungi, *α–helix*. Din cauza configurației L a aminoacizilor pe care o compun, spirala sau α–helixul, cel mai frecvent, are sensul unui șurub de dreapta (rotire de la stânga la dreapta), iar resturile R ale aminoacizilor sunt direcționate către exterior. În acest model, gruparea este planară din cauza rezonanței, iar resturile de aminoacizi sunt rotite unul față de altul, așa încât să fie posibile legăturile de hidrogen intramoleculare, unind grupele CO și NH din spiralele consecutive ale elicei. Aceste legături asigură soliditatea întregii construcții.

Structura terțiară se raportează la conformația moleculară, referindu-se la modul de înclinare sau pliere a lanțurilor polipeptidice în spațiul tridimensional la proteinele fibrilare sau formarea structurii compacte a proteinelor globulare. Macromoleculele proteice sunt formate, de cele mai multe ori, din mai multe lanțuri polipeptidice, care se unesc între ele prin diferite tipuri de legături: covalente, electrovalente, de hidrogen, Van der Waals.

Experimente cu privire la renaturarea proteinelor globulare arată că secvența aminoacizilor determină structura terțiară a acestora, ceea ce este o reflectare a diferitelor tipuri de restricții asupra libertății de rotație în jurul legăturilor simple din lanțul polipeptidic.

Restricțiile sunt cele menționate în subcapitolul 11.2., referitoare la natura rigidă, planară a legăturilor peptidice, unghiurile permise φ și ψ ale legăturilor C_α–N și C_α–C dintre resturile succesive, numărul și localizarea resturilor hidrofobe și hidrofile din secvență, ca și numărul și localizarea grupelor R încărcate pozitiv sau negativ.

Structura terțiară a proteinelor globulare este stabilizată prin legături de hidrogen între grupele peptidice ca în α–helix sau în structura de foaie pliată a conformației β; legături de hidrogen între grupele R; interacții hidrofobe între grupele R nepolare; legături ionice între grupele încărcate pozitiv și cele încărcate negativ, cum sunt grupele $-NH_3^+$ ale lizinei sau $-COO^-$ ale acizilor aspartic și glutamic. Grupele R nepolare în proteinele globulare native fiind apărate de expunerea la apă nu vor contribui la destabilizarea proteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

Unele proteine globulare constituite din două sau mai multe lanțuri polipeptidice sunt *oligomere*. La proteinele globulare, modul caracteristic în care se așază lanțurile polipeptidice individuale, unele față de altele, formează structura *cuaternară*.

Când proteinele globulare oligomere sunt supuse la temperaturi mai mari decât cea fiziologică sau tratate cu soluții concentrate de uree sau guanidină, se produce denaturarea lor prin disocierea lanțurilor polipeptidice, unele de altele și apoi deplierea lanțurilor individuale în spirale neregulate. Unele proteine oligomere, chiar la o denaturare drastică, se pot renatura și își pot recăpăta funcțiile lor biologice. Aceasta este o dovadă că secvențele de aminoacizi ale lanțurilor polipeptidice din proteinele oligomere determină nu numai structura lor secundară și terțiară, ci și forma locurilor de contact, care face posibilă potrivirea cu exactitate a lanțurilor polipeptidice și asocierea lor strânsă în structura cuaternară respectivă.

Structura cuaternară se formează din mai multe structuri terțiare, care se unesc între ele, dând naștere la construcții mai complexe, numite *structuri cuaternare*. Forțele de atracție sunt aceleași, ca și în structurile terțiare, mai puțin legăturile covalente, cu deosebirea că ele acționează, în acest caz, intermolecular.

Uneori, un grup de proteine care funcționează împreună se întâlnesc în celulă sub formă de *cluster*, un ansamblu sau un complex supramolecular.

Structura primară constă din numărul și succesiunea resturilor de aminoacizi din catena polipeptidică. Pentru elucidarea succesiunii aminoacizilor structurii primare, se procedează la desfacerea reproductibilă a lanțului polipeptidic în fragmente cât mai mari. Apoi, după despărțirea acestora, se scindează din nou, reproductibil, în părți mai mici, care, de asemenea, se izolează. Se ajunge, astfel, la peptide de 2 – 20 aminoacizi care sunt accesibile determinării directe a secvenței aminoacizilor. Apoi, secvențele parțiale se îmbină din nou în secvențe totale.

Scindarea lanțului polipeptidic se poate face chimic sau enzimatic. Înainte de scindare, lanțul este pregătit prin desfășurarea amplă a structurii spațiale, tratându-se cu o soluție de 8 M uree, când se rup eventualele punți disulfidice și, în continuare, se blochează toate resturile de cisteină prin reducere cu mercaptoetanol sau ditioeritrit și apoi cu acid iodacetic sau acrilonitril pentru carboximetilarea tuturor grupelor SH.

Scindarea enzimatică se realizează cu enzime proteolitice, dar cele mai multe au o specificitate redusă pentru scindarea legăturii peptidice din dreptul unui anumit aminoacid.

Scanned with OKEN Scanner

Deosebit de selectivă este tripsina care catalizează hidroliza legăturilor peptidice de la arginină şi lizină. În cazul lanţurilor foarte lungi, este de dorit să se hidrolizeze, mai întâi, cât mai puţine legături peptidice. Fragmentele mari sunt separate unul de altul, înainte de a fi descompuse mai departe pentru determinarea secvenţelor parţiale. Acest lucru uşurează, mai târziu, combinarea în secvenţa totală. În acest scop, lanţurile laterale de lizină sunt blocate reversibil cu trifluoracetil. Prin aceasta, secvenţa este scindată doar la arginină. După separarea acestor peptide-arginină-COOH, se desprinde gruparea de protecţie şi peptidul este tratat apoi cu tripsină, obţinându-se peptide-lizină-COOH.

Mai puţin specifică este chimotripsina care hidrolizează legăturile peptidice în partea C-terminală de la tirozină, fenilalanină, metionină, dar şi de la leucină, izoleucină, histidină şi alţi aminoacizi. Se obţine, astfel, un amestec de peptide care nu este complet reproductibil, la fel ca şi la utilizarea pepsinei sau papainei.

Scinarea cu tripsină şi chimotripsină are loc la pH = 7,5 şi respectiv 9,0, iar menţinerea constantă a pH-ului pe parcursul procesului se realizează prin neutralizarea treptată a grupelor carboxilice eliberate de la lizină şi arginină prin titrare cu o soluţie de hidroxid de sodiu. În funcţie de cantitatea de hidroxid de sodiu consumată, se stabileşte cantitatea de lizină şi arginină pe care o posedă proteina şi, astfel, se controlează descompunerea.

Pentru enzimele care acţionează în mediu acid, se foloseşte reacţia cu ninhidrină, în vederea determinării grupelor aminice eliberate.

Scindarea chimică poate servi la determinarea secvenţei aminoacizilor din peptide şi proteine. Sanger şi Thompson (1953) au determinat secvenţa aminoacizilor în lanţurile A şi B ale insulinei, prima proteină a cărei structură covalentă a fost cunoscută.

În vederea determinării secvenţei aminoacizilor din peptide sau proteine se parcurg următoarele etape:

– Proteinele care conţin mai multe lanţuri polipeptidice se separă şi se purifică;

– Grupările disulfidice pe care le conţin se reduc la grupări sulfhidrilice şi se alchilează;

– Fiecare lanţ polipeptidic se hidrolizează total şi se determină compoziţia în aminoacizi;

– Se identifică resturile N– şi C–terminale;

– Un lanţ polipeptidic este scindat în peptide mai mici, prin hidroliză chimică sau enzimatică;

Scanned with OKEN Scanner

– Fragmentele de lanţ se separă între ele şi se determină compoziţia şi secvenţa aminoacizilor pentru fiecare în parte;

– Un lanţ polipeptidic nativ este scindat în fragmente printr-un alt procedeu decât primul, pentru a se produce fragmentarea în alte puncte, apoi fragmentele rezultate se separă şi se determină compoziţia şi secvenţa aminoacizilor;

– Se cercetează secvenţele aminoacizilor din cele două serii, pentru a se realiza punerea cap la cap a fragmentelor, în vederea stabilirii secvenţei aminoacizilor lanţului polipeptidic studiat;

– Se determină poziţia punţilor disulfidice şi a grupărilor aminice.

a) Proteinele care conţin mai multe lanţuri polipeptidice se separă şi se purifică. Numărul de lanţuri este dedus din numărul de resturi de aminoacizi N-terminali din molecula de proteină.

Pentru identificarea restului de aminoacid N-terminal, sunt mai multe posibilităţi. Cea mai mult folosită este metoda lui Edman, în care fenilizotiocianatul reacţionează cantitativ cu grupa aminică liberă a peptidei, formând feniltiocarbamoilpeptidul corespunzător. La tratare cu acid restul de aminoacid N-terminal este scindat ca feniltiocarbamoil-aminoacid, iar restul lanţului peptidic rămâne neschimbat (fig. 11.9.).

Feniltiocarbamoil-aminoacidul este ciclizat la derivatul feniltiohidantoinic care poate fi separat şi identificat prin cromatografia în gaz-lichid.

Faptul că restul lanţului peptidic, după îndepărtarea aminoacidului N-terminal, rămâne intact, face ca metoda Edman să poată fi folosită pentru identificarea secvenţială a celorlalţi aminoacizi ai peptidei.

Prima metodă de determinare a resturilor de aminoacizi N–terminali a fost propusă de F. Sanger (1953), care a constatat că grupările libere α–aminice neprotonate ale peptidelor reacţionează cu 2, 4–dinitrofluor-benzenul (DNFB) formând derivaţi 2,4–dinitrofenil galbeni. Dacă aceşti derivaţi ai peptidei sunt supuşi hidrolizei cu HCl 6N, toate legăturile peptidice sunt hidrolizate.

Face excepţie legătura dintre gruparea 2,4–dinitrofenil şi grupa α–aminică a aminoacidului N–terminal, care este relativ stabilă la hidroliza acidă (fig.11.10.) (3). Derivatul 2,4–dinitrofenil–aminoacid N–terminal poate fi uşor separat de restul de aminoacizi rezultaţi la hidroliza acidă şi poate fi identificat prin comparare cu cromatogramele unor derivaţi dinitrofenil cunoscuţi ai diferiţilor aminoacizi.

Metoda Sanger a fost înlocuită cu procedee mai sensibile, ca acel în care se foloseşte clorura de dansil (1– dimetilaminonaftalin–5–sulfonil).

Scanned with OKEN Scanner

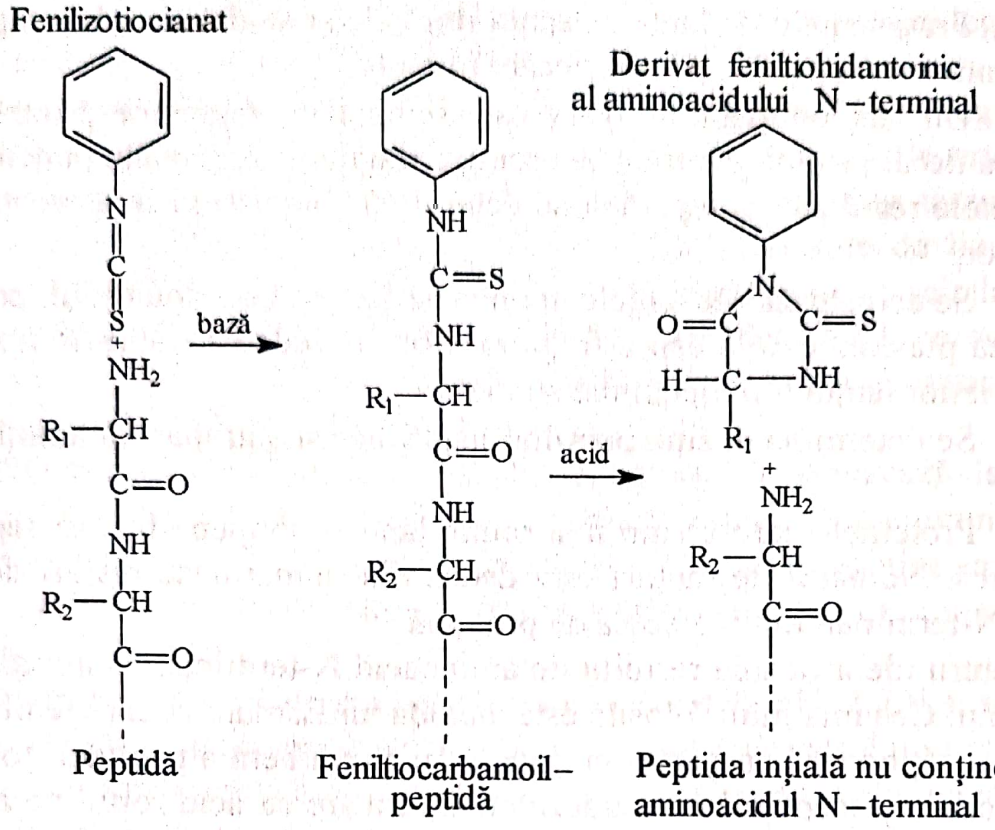


Fig. 11.9. Identificarea aminoacidului N – terminal prin metoda Edman (3)

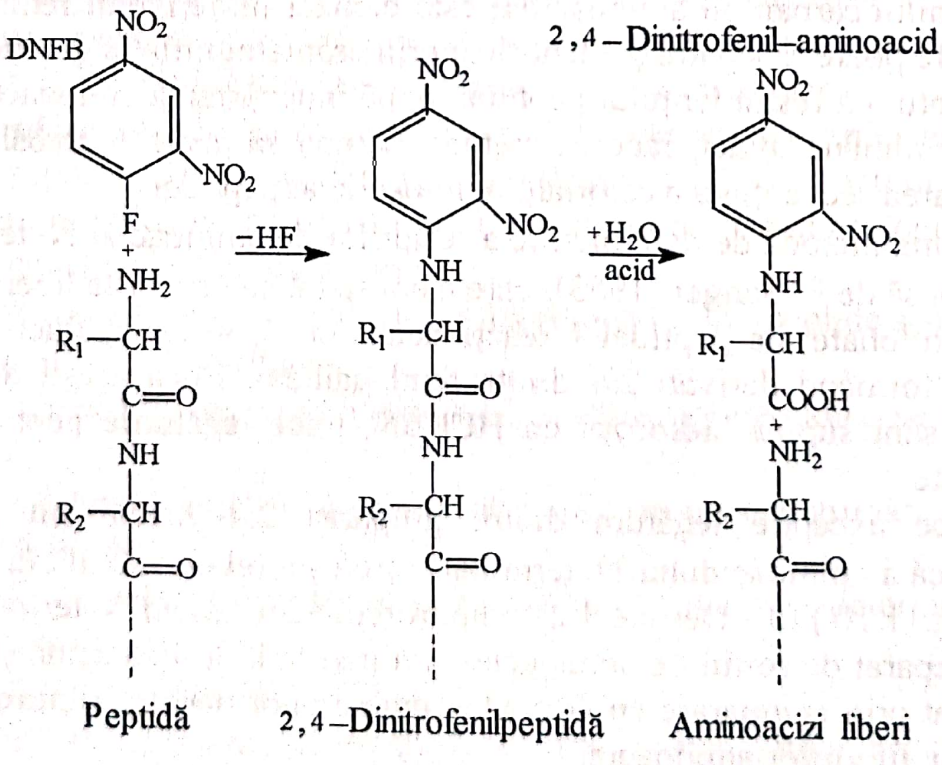
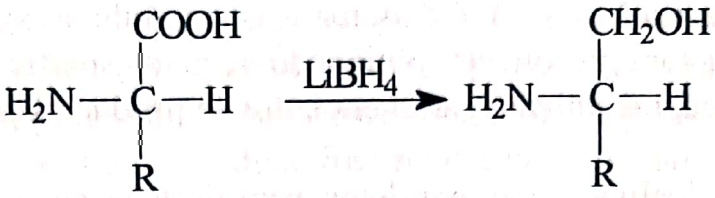


Fig. 11.10. Identificarea aminoacidului N – terminal prin metoda Sanger

Scanned with OKEN Scanner

Aminoacidul C–terminal al peptidelor poate fi identificat prin reducerea sa cu un agent puternic reducător, borohidrură de litiu ($LiBH_4$), în mediu anhidru, cu formarea alcoolului primar corespunzător:

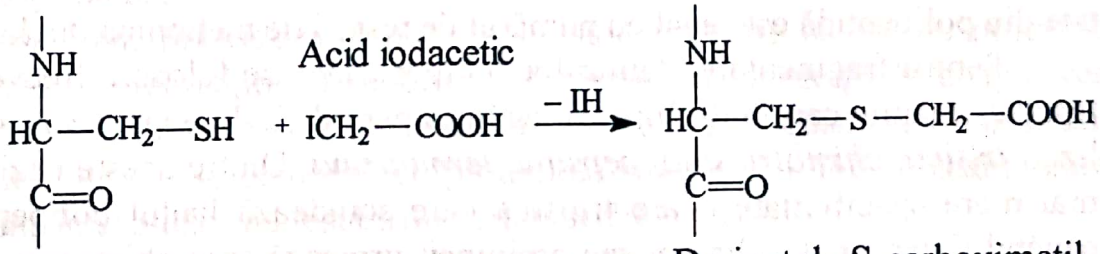


Dacă peptida este complet hidrolizată, hidrolizatul rezultat conţine o moleculă de α–aminoalcool corespunzător aminoacidului C–terminal, care poate fi identificat pe cale cromatografică.

Un alt procedeu de identificare a aminoacidului C–terminal este *hidrazinoliza*, prin care toate legăturile peptidice sunt desfăcute, iar aminoacizii, cu excepţia aminoacidului C–terminal, reacţionează cu hidrazina, formând hidrazide. Aminoacidul C–terminal este, apoi, identificat cromatografic.

b) În cazul proteinelor care conţin mai multe lanţuri polipeptidice şi acestea sunt legate transversal prin una sau mai multe punţi disulfidice, în mod normal, aceste punţi pot fi desfăcute prin reducerea lor la grupări sulfhidril în prezenţa unui exces de mercaptoetanol. Grupările sulfhidril se alchilează cu agenţi de alchilare, ca de exemplu acid iodacetic şi se formează derivaţi S-carboximetil:

Peptidă cu rest de cisteină



Derivat de S-carboximetil al peptidei

Alţi agenţi de alchilare folosiţi sunt: iodacetamida şi etilenimina. Alchilarea resturilor de cisteină trebuie făcută, deoarece grupele sulfhidril sunt instabile şi au tendinţa de a se oxida.

c) Lanţul polipeptidic separat şi purificat, fără punţi disulfidice sau grupări sulfhidrilice libere se supune hidrolizei totale şi se determină compoziţia în aminoacizi. Legăturile peptidice sunt hidrolizate la cald cu o soluţie acidă sau bazică.

Scanned with OKEN Scanner

Prin fierbere la 100 – 120°C, cu un exces de soluție de acid clorhidric 6 N, într-un vas închis, legăturile peptidice din polipeptide sunt în totalitate hidrolizate. Pe această cale, triptofanul este complet distrus, iar serina şi treonina, într-o mai mică măsură. De asemenea, grupările amidice ale asparaginei şi glutaminei sunt hidrolizate, obținându-se acid aspartic şi acid glutamic. La hidroliza acidă, racemizarea aminoacizilor se produce într-o mică măsură sau deloc.

Hidroliza alcalină a polipeptidelor, prin fierbere cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu, determină distrugerea cisteinei, serinei şi treoninei şi racemizarea tuturor aminoacizilor. Triptofanul este stabil la hidroliza alcalină.

Compoziția în aminoacizi a hidrolizatelor este determinată pe cale cromatografică.

d) Următoarea etapă la determinarea secvenței aminoacizilor este fragmentarea lanțului polipeptidic în peptide mici, care pot fi separate şi identificate. Aceasta se realizează printr-o hidroliză parțială sau selectivă a lanțului polipeptidic. Se poate folosi hidroliza parțială cu un acid diluat, deoarece legăturile peptidice dintre unele perechi de aminoacizi sunt mai sensibile la hidroliza acidă.

Pentru desfacerea lanțului polipeptidic în fracțiuni specifice de lanț, s-au elaborat o serie de metode chimice, dintre care se menționează reacția polipeptidului cu bromcianul (BrCN), care desface legăturile peptidice la care participă gruparea carboxilică de la metionină, iar metionina este convertită într-un rest de *homoserin–lactonă* C-terminală. Numărul de fragmente rezultate din polipeptidă este egal cu numărul de resturi de metionină din lanț.

Pentru fragmentarea lanțurilor polipeptidice, se folosesc frecvent *proteazele*, enzime care hidrolizează legătura peptidică. În acest scop, s-au utilizat: *trisina, chimotripsina, pepsina, termolizina.* Dintre aceste enzime, cea mai mare specificitate o are tripsina care scindează lanțul polipeptidic la capătul C-terminal al lizinei sau argininei, urmează apoi chimotripsina care scindează la capătul C-terminal al fenilalaninei, triptofanului sau tirozinei, pepsina scindează la capătul C-terminal al fenilalaninei, triptofanului, tirozinei şi alții. Temolizina, o protează bacteriană termostabilă, poate hidroliza legăturile peptidice în care funcția amino provine de la aminoacizi nepolari ca leucina, izoleucina, valina.

e) Pentru studiul secvenței aminoacizilor, este necesară separarea peptidelor (a fragmentelor de lanț) obținute, pentru care se folosesc două tehnici: cromatografia pe hârtie sau electroforeza pe hârtie şi cromatografia pe coloană.

f) După separarea fragmentelor peptidice rezultate la hidroliza parțială a lanțului polipeptidic, câte o probă din fiecare fragment este hidrolizată

Scanned with OKEN Scanner

complet şi se determină compoziţia în aminoacizi. Apoi, pe alte probe, se determină secvenţa aminoacizilor fiecărui fragment peptidic prin degradarea secvenţială după metoda Edman. Dacă fragmentul peptidic este prea lung, se identifică resturile de aminoacizi N– şi C–terminale, se segmentează fragmentul peptidic şi se determină, din peptidele mici, secvenţa aminoacizilor.

g) Un lanţ polipeptidic nativ este scindat în fragmente prin două procedee diferite, pentru a se produce fragmentarea, la fiecare procedeu, în alte puncte. De exemplu, se face o fragmentare cu bromcian şi alta cu tripsină. Ştiindu-se locurile de scindare în cazul celor două fragmentări, se pot ordona fragmentele peptidice din lanţul polipeptidic. Apoi, fragmentele rezultate se separă şi se determină compoziţia şi secvenţa aminoacizilor.

h) Se determină poziţia punţilor disulfidice şi a grupărilor aminice ale lanţului polipeptidic studiat.

11.4. FUNCŢIILE BIOLOGICE ALE PROTEINELOR

După funcţia lor biologică, proteinele se pot grupa în: *enzime, proteine cu rol de protecţie din sângele vertebratelor, proteine de rezervă, hormoni, toxine, proteine de transport, proteine contractile, proteine structurale.*

Enzimele, circa 2 000 de tipuri diferite, fiecare catalizând un anumit tip de reacţie chimică, având o specificitate mai mare sau mai mică, sunt proteine globulare.

Trombina, fibrinogenul, anticorpii, sunt proteine cu rol de protecţie din sângele vertebratelor. Trombina şi fibrinogenul participă la coagularea sângelui, prevenind pierderile de sânge din sistemul vascular. Anticorpii sau globulinele imune se combină cu proteinele străine sau alte substanţe care au pătruns în sângele sau ţesuturile vertebratelor, inactivându-le.

Proteinele de rezervă (*ovalbumina, cazeina, gliadina, zeina* etc.) au funcţia de depozitare a aminoacizilor, pentru a servi ca substanţe nutritive sau ca unităţi de construcţie a embrionului în creştere.

Hormonii au diferite funcţii biologice specifice. Astfel, *insulina* secretată de celule specializate ale pancreasului reglează metabolismul glucozei; *hormonul de creştere* sau *somatotropina* secretat de hipofiza anterioară are ca funcţie principală stimularea sintezei de proteine în toate ţesuturile, determinând creşterea greutăţii corporale; *corticotropina* (*adenocorticotropina*) reglează funcţia cortexului suprarenalelor etc.

Toxinele sunt substanţe deosebit de toxice pentru animalele superioare. Dintre acestea, se menţionează: *ricinul* din seminţele de ricin, *gossipina* din

semințele de bumbac, toxina din *Clostridium botulinum* care produce intoxicații bacteriene alimentare, *toxina de difterie*, o toxină bacteriană etc.

Proteinele de transport (*hemoglobina, hemocianina,mioglobina, albumina serică, β_1–lipoproteina, globulina fixatoare de fier, ceruloplasmina*) leagă și transportă anumite molecule pe calea sângelui. Hemoglobina din eritrocitele vertebratelor transportă oxigenul de la plămâni la țesuturi. Hemocianinele transportă oxigenul în cazul nevertebratelor. Albumina serică leagă și transportă acizii grași între țesutul adipos și alte țesuturi sau organe ale vertebratelor. Lipoproteinele din plasma sanguină transportă lipidele între intestin, ficat și unele țesuturi. Ceruloplasmina transportă cuprul în sânge.

Proteinele contractile (*miozina, actina, dineina*) au rol în sistemele de contracție și mișcare. Actina și miozina au roluri însemnate în sistemul de contracție a mușchilor scheletici la vertebrate, iar dineina, în mișcarea cililor și flagelilor.

Proteinele structurale (*proteine din învelișurile virale, colagenul, α–keratina, elastina, reticulina, mucoproteine, glicoproteine, fibroina, sclerotina*) au roluri însemnate în structura organismelor. Colagenul, proteină extracelulară, este predominant în țesutul conjunctiv și osos, de asemenea, fibrilele de colagen participă la legarea împreună a unui grup de celule, la formarea unui țesut. Keratinele provin din celulele ectodermului și sunt prezente în epiderm, ca și în derivații biologici ai ectodermului, cum sunt: părul, lâna, solzii, penele, unghiile, copitele, coarnele. Elastina și reticulina se găsesc în țesutul elastic. Cartilajele, ligamentele, tendoanele conțin, alături de proteinele fibroase, și mucoproteine care au, printre altele, rol de lubrifiant. Proteinele din învelișurile virale se găsesc în teaca din jurul acizilor nucleici. Sclerotina formează exoscheletul insectelor. Fibroina se găsește în constituția firului de mătase și a firelor de păianjen.

11.5. DENATURAREA PROTEINELOR

Denaturarea proteinelor este o modificare a stării native, tridimensionale, a lanțurilor polipeptidice ale moleculei proteice, ducând la o structură mai puțin ordonată. Denaturarea implică energii care produc doar modificarea structurii secundare și terțiare, iar structura primară rămâne intactă. Acest efect are loc la tratarea proteinelor cu agenți liotropi în concentrații mari (uree, guanidină, $CaCl_2$ etc.), la încălzirea la temperaturi peste 60 – 70°C în soluții apoase, la modificarea pH-ului fiziologic înspre PH = 3 sau pH = 9

Scanned with OKEN Scanner

şi chiar mai mult, iradierea cu raze ultraviolete sau raze Röntgen, tratarea cu tensioactivi şi cu unii dizolvanţi organici (alcool etilic, acetonă etc.).

Forma nativă a proteinelor este cea mai săracă în energie. În timpul denaturării, se schimbă ordonarea strictă a lanţurilor polipeptidice şi a celor laterale.

Dintre toate însuşirile fizice ale proteinelor native, aceea care suferă modificarea cea mai uşor de observat este solubilitatea.

Cele mai multe molecule proteice îşi păstrează activitatea biologică numai pe intervale de temperatură şi pH limitate, apropiate de temperatura şi pH-ul fiziologic. De exemplu, prin denaturare, enzimele îşi pierd activitatea lor catalitică.

Denaturarea înseamnă desfacerea structurii normale specifice moleculelor proteice native fără ruperea legăturilor covalente peptidice din lanţurile polipeptidice şi nici a altor legături covalente, cu excepţia unor legături disulfidice. Studiul energetic duce la concluzia că denaturarea este cauzată de ruperea unui număr mai mare sau mai mic de legături slabe, cum sunt: legăturile ionice, legăturile de hidrogen şi forţele van der Waals. Totodată, se produce o schimbare importantă în conformaţia moleculei.

Dacă modificările conformaţionale nu sunt prea adânci şi temperatura şi pH-ul revin la valoarea fiziologică, molecula proteică depliată revine la forma nativă, biologic activă, prin reformarea legăturilor dintre lanţurile polipeptidice, are loc procesul de *renaturare* sau de *reconstituire*.

Secvenţa de aminoacizi din lanţurile polipeptidice conţine informaţia necesară specificităţii conformaţiei native pliate, iar această conformaţie nativă (forma tridimensională caracteristică) determină activitatea biologică a proteinei.

11.6. STABILITATEA ŞI FUNCŢIILE PROTEINELOR

Procesele vitale sunt dependente de prezenţa proteinelor care au rol de catalizatori, de molecule structurale, transport molecular etc. Pentru îndeplinirea funcţiilor lor în activitatea biologică, trebuie ca lanţurile polipeptidice, din care sunt alcătuite, să fie corect împăturite în structura tridimensională a stării naturale. În succesiunea de împăturire spontană a proteinelor în stare nativă, trebuie să scadă în energie Gibbs faţă de starea desfăşurată. Faţă de această constatare, Anfinsen consideră că stările native şi desfăşurate sunt în echilibru, iar starea nativă este, în general, la minimum de energie Gibbs, care se realizează fără ruperea legăturilor covalente.

Scanned with OKEN Scanner

Deoarece starea nativă şi cea desfăşurată sunt în echilibru, reacţia de împăturire poate fi cuantificată în termeni ai termodinamicii.

Contribuţia diferitelor interacţiuni la mărimile termodinamice poate fi explorată în sensul cunoaşterii cum contribuie ele la stabilitatea proteinei. Echilibrul dintre starea nativă (N) şi desfăşurată (D) este definit prin constanta de echilibru K:

$$K = \frac{[D]}{[N]}$$

Diferenţa de energie liberă între stările desfăşurată şi nativă este:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

unde R este constanta universală a gazelor şi T este temperatura absolută în ^{0}K.

Energia liberă este compusă din contribuţiile entalpică şi entropică:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

în care ΔH^0 este schimbul entalpic şi ΔS^0 schimbul entropic în desfăşurare.

Interacţiunile considerate a domina stabilitatea proteinelor sunt: efectul hidrofobic, legătura de hidrogen şi aspectul entropic.

Efectul hidrofobic, în general, se referă la slaba solubilitate a compuşilor hidrofobi în apă (de exemplu, compuşii apolari).

Legătura de hidrogen intramoleculară, la proteine, concurează cu legăturile de hidrogen ale moleculelor de apă. Este competiţia care determină contribuţia legăturii de hidrogen la stabilitatea proteinei.

Într-o proteină desfăşurată, lanţul polipeptidic poate lua diferite poziţii rotametrice în jurul unghiurilor torsionale φ şi ψ şi o parte a lanţurilor pot adopta diferite unghiuri rotametrice în jurul χ. La starea nativă, aproape toate unghiurile φ şi ψ au restricţii pentru o singură poziţie, aşa cum este, în majoritate, unghiul χ. Această pierdere a gradului de libertate se transpune în pierderea entropiei configuraţionale.

Stabilitatea proteinei este afectată de factori ai mediului înconjurător ca: temperatura, pH-ul şi prezenţa sărurilor.

Temperatura afectează stabilitatea, modificând aportul efectului hidrofobic, a legăturilor de hidrogen şi a entropiei configuraţionale.

Stabilizarea proteinelor în prezenţa osmoliţilor. Este important de cunoscut mecanismele folosite de plante, animale şi microorganisme, pentru adaptarea la condiţiile mediului înconjurător din biosferă, care pot denatura proteinele şi degrada procesele celulare. Mediul înconjurător defavorabil duce la solicitări extreme care produc denaturarea. Dintre acestea, se menţi-

Scanned with OKEN Scanner

onează: temperatura, deshidratarea celulară, uscarea, concentrația mare în săruri, pH-ul, ca şi prezența în celulă a unor concentrații mai mari de uree.

Unele plante, animale, microorganisme s-au adaptat mediului înconjurător extrem, acumulând concentrații însemnate de molecule organice mici, numite *osmoliți*, care protejează componenții celulari împotriva denaturării. Astfel, dizaharidul trehaloza este principalul osmolit care protejează împotriva uscării.

Nu toate moleculele organice mici acumulate intracelular au rol de protecție împotriva denaturării elementelor celulare. Astfel, ureea se poate acumula în celulele renale de la mamifere, producând efecte de denaturare asupra proteinelor intracelulare.

Osmoliții cu acțiune protectoare sunt unii polioli ca: glicerolul, zaharoza, trehaloza şi alte zaharuri; unii aminoacizi, printre care: prolina şi glicina; anumite metilamine ca sarcosina, N-oxid trimetilamina şi betaina etc.

Poliolii protejează organismele împotriva temperaturii, deshidratării sau uscării; aminoacizii protejează celulele împotriva mediului înconjurător, prezentând concentrații mari în săruri.

Legătura termodinamică între structură, stabilitate şi funcție la proteine.

Multe proteine suferă schimbări conformaționale în timpul activității lor sau flexibilitatea lor conformațională devine critică în activitatea biologică.

În multe cazuri, conformația proteinelor se schimbă atunci când un ligand este fixat.

Capacitatea schimbului de căldură observată la proteina destabilizată este, în mare măsură, rezultatul schimbului în hidratarea grupelor reactive, care sunt ferite de solvent în stare nativă şi ajung expuse la solvent, la destabilizare.

În cursul desfăşurării funcțiilor lor biologice, proteinele interacționează cu alte macromolecule. Ca rezultat al acestor interacțiuni, proprietățile proteinelor pot fi modificate în diferite feluri. Interacțiunea cu alte molecule poate modifica proteina de la o stare funcțională la alta, prin stabilizarea selectivă a unor structuri.

Stabilitatea conformațională este definită prin schimbul de energie liberă la reacția de destabilizare, $F \leftrightarrow U$, în condițiile de mediu (în general, în jurul temperaturii camerei şi la pH neutru):

$$\Delta G = G_U - G_F$$

Aceasta poate fi evaluată folosind relația:

$$\Delta G_U = - RT \ln K_U$$

unde K_U este constanta de echilibru la reacția de destabilizare.

11.7. PROTEINE MAI IMPORTANTE

Într-o clasificare dată anterior, proteinele s-au împărţit în solubile în apă şi insolubile sau scleroproteine. O a treia clasă este aceea a proteidelor (proteine conjugate), care sunt combinaţii între o proteină şi o componentă neproteică, aşa-numita grupă prostetică; acestea sunt mai apropiate, prin proprietăţile lor, de proteinele solubile.

11.7.1. PROTEINE SOLUBILE

Albumine şi ***globuline animale.*** Sunt mult răspândite în natură şi apar adesea împreună.

Albuminele sunt proteine solubile în apă şi în soluţii diluate de acizi, baze sau săruri, iar globulinele sunt proteine solubile numai în soluţii de electroliţi. Din aceste două clase de proteine, fac parte proteinele din sânge, proteinele din muşchi, proteinele din ou şi din lapte.

Sângele este o suspensie a unor corpuscule mari, vizibile la microscop: *globulele roşii, globulele albe* într-un lichid numit *plasmă*. Globulele roşii conţin toată proteina colorată în roşu, *hemoglobina*. Plasma conţine, în soluţie, *fibrinogenul, albumina şi globulinele.* Lichidul rămas după îndepărtarea globulinelor şi fibrinogenului se numeşte *serul sanguin*.

Albumina plasmatică (*serum albumina)*, reprezintă 55 – 60 % din totalul proteinelor plasmatice, deci este cea mai abundentă proteină a serului. Are masa moleculară de 65 000 – 69 000 şi este formată dintr-un singur lanţ polipeptidic ce conţine mai mult de 580 aminoacizi. Este sintetizată de ficat şi posedă o grupă tiol liberă ce permite formarea de complexe cu metale ca: Hg, Zn, Ag, Cu. *Serum albumina* are rolul de a menţine constantă presiunea osmotică a serului, de asemenea, are rol de transportor al medicamentelor, al acizilor graşi, pigmenţilor biliari, vitaminelor, hormonilor, ionilor etc.

Globulinele din serul sanguin sunt insolubile în apă pură, au masa moleculară medie de 150 000 şi punctul izoelectric, în zona neutră a pH-ului. Globulinele sunt solubile în soluţii saline diluate, precum şi în soluţii acide sau bazice diluate. Se pot precipita cu o soluţie concentrată de sulfat de amoniu. De asemenea, se găsesc în plasmă (α–, β– şi γ–globuline), în ţesutul muscular (*miozina)*, în ou (*ovoglobulina*). γ–Globulinele au rol de anticorpi.

Scanned with OKEN Scanner

În albuşul de ou, principalele proteine sunt: o albumină (*ovoalbumina)*, o globulină şi două proteide: *conalbumina* (flavoproteină) şi *ovomucoida* (mucoidă). Albumina din ou este un amestec de mai multe substanţe proteice. Astfel, *vitelinele,* asemănătoare caseinelor, sunt fosfoproteide şi au aceleaşi funcţii fiziologice, ca şi a caseinelor, de a furniza aminoacizii şi fosforul necesar dezvoltării embrionului sau animalului tânăr.

În lapte, alături de cazeină, care reprezintă 78 % în laptele de vacă, se găsesc albumine şi globuline (17 % în laptele de vacă), dintre care α*–lactalbumina* şi β*–lactoglobulina,* care se pot obţine din zerul rezultat după precipitarea caseinei din lapte.

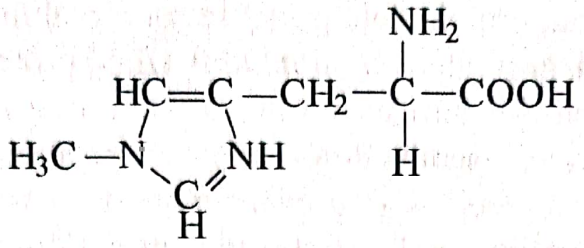
În muşchii vertebratelor, alături de proteinele cu funcţie structurală, se găsesc proteine solubile, unele cu funcţie contractilă, altele cu funcţie enzimatică. Proteinele solubile pot fi extrase cu soluţii saline. Din muşchii vertebratelor, au fost izolate: *miogenul, miosina, globulina X, stroma musculară, tropomiosina şi actina.*

Proteinele intracelulare ale celulelor muşchiului scheletic se divid în două categorii: proteinele solubile în apă ale *sarcoplasmei* (lichidul intracelular al muşchiului, care conţine glicogen, enzime glicolitice şi intermediarii lanţului glicolitic, ATP, ADP, AMP, fosfat, fosfocreatină, creatină, electroliţi anorganici, aminoacizi şi peptide şi care înconjoară miofibrilele), care reprezintă 20 – 25 % din proteina totală musculară şi proteinele filamentoase insolubile în apă ale miofibrilelor.

Proteinele solubile sarcoplasmatice se pot uşor extrage din muşchi cu apă rece; această fracţiune este numită *miogen.* Miogenul conţine enzime glicolitice ca: gliceraldehid-fosfatdehidrogenaza, glicerol-fosfat dehidrogenaza, aldolaza, fosforilaza.

Actina se prezintă în două forme: actina G (actina globulară) şi actina F (actina fibroasă), un polimer al actinei G. Actina G, o proteină globulară cu masa moleculară de 46 000, este stabilă în apă distilată, fiecare moleculă leagă un ion de Ca^{2+}, de asemenea, o moleculă de ATP sau ADP. Legarea ATP-ului de către actina G duce la polimerizarea acesteia cu formare de actină F. Actina G, ca şi miosina, conţine un rest de *3–metilhistidină*, un aminoacid puţin obişnuit:

Scanned with OKEN Scanner



3–metilhistidină

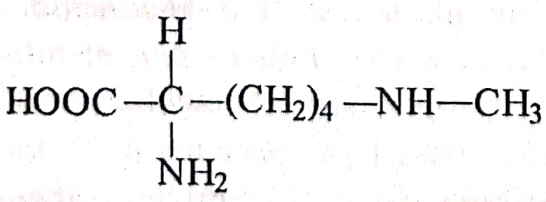
Două lanţuri de actină F, fiecare compus din monomeri de actină G sunt răsucite, unul cu altul, la alcătuirea filamentelor subţiri. Filamentele subţiri conţin, de asemenea, două proteine suplimentare: *tropomiosina* şi *troponina.*

Tropomiosina reprezintă aproximativ 11 % din proteina contractilă totală a muşchiului. Ea este constituită din două tipuri de lanţuri diferite polipeptidice α–helicoidale care se răsucesc împreună şi are o masă moleculară de circa 70 000. Moleculele de tropomiozină se asociază cap la cap şi formează fibrile care se dispun sub formă de reţea.

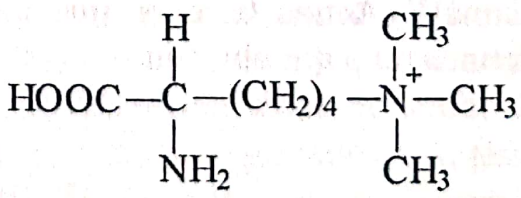
Troponina este o proteină globulară formată din trei lanţuri polipeptidice. Fiecare moleculă de troponină este ataşată de filamentul subţire prin două situsuri de legare, unul specific pentru lanţul de actină şi cel de al doilea, pentru lanţul de tropomiozină.

În muşchiul scheletic, există două componente proteice majore filamentoase, insolubile în apă, miozina (componenta majoră a filamentelor groase) şi actina (componenta majoră a filamentelor subţiri). Acestea formează până la 80 % din proteinele aparatului contractil. În plus, există cel puţin şase alte componente proteice: *tropomiosina, troponina, proteina liniei M, actinina α* şi *actinina β.*

Miosina este o moleculă lungă (circa 160 nm), asimetrică, formată din două lanţuri polipeptidice lungi, identice de aproximativ 200 000 daltoni, fiecare având circa 1 800 aminoacizi, cu un cap globular şi o masă moleculară de 460 000. Miozina conţine trei aminoacizi neobişnuiţi: 3–*metilhistidină,* ε–N–*monometillizină* şi *ε–N–trimetillizină.*



ε–N–*monometillizină*



ε–N–trimetillizină

Miosina leagă actina în două locuri specifice, pentru a forma *actomiozina*, care are un rol însemnat în mecanismul contractil al muşchiului.

Proteine vegetale. *Globulinele vegetale* sunt răspândite în natură, alături de albumine. Soluţiile lor sunt puţin vâscoase şi coagulează mai greu decât globulinele animale. Se menţionează globulinele din seminţele oleaginoase (*excelsina* din nuca braziliană, *amandina* din migdale, *corilina* din alune), gloBulinele din leguminoase (*faseolina* din fasole, *legumina* din mazăre) şi globuline din cartofi, tomate spanac etc. (2).

Proteina din grâu, ***glutenul*** este, de fapt, un amestec de două proteine: *glutenina* şi *gliadina.*Gliadina este singura proteină care se solvă în alcool de 70 % şi, pe această cale, se poate separa de glutenină.

Gliadina are un conţinut ridicat de acid glutamic (40 %). Grupele carboxilice ale resturilor laterale ale acidului glutamic sunt amidificate şi de aceea gliadina nu este o proteină acidă ca glutenina (2).

Glutenina este solubilă în soluţii foarte diluate de hidroxizi alcalini şi apoi poate fi precipitată din soluţie prin acidulare. Glutenina este un aliment aproape complet. Unele cereale, cum este porumbul nu conţine glutenină, iar gliadina sa, numită *zeină*, nu conţine lizină, este săracă în triptofan, iar porumbul nu conţine nici vitamina antipelagroasă (Niacina, Factor PP, nicotinamida). Orezul nu conţine gliadină şi este un aliment mai valoros decât porumbul.

Proteine fiziologic active. Unele proteine din organismele vii intervin în procesele fiziologice esenţiale, aşa cum sunt*: enzimele, hormonii, toxinele.*

Enzimele sunt, fără excepţie, proteine, au rolul de catalizatori organici. În această lucrare, sunt tratate în capitolul 6.

Hormonii sunt produşi de secreţie internă a unor celule specializate (glande sau ţesuturi) şi ajung, pe cale sanguină, în concentraţii foarte mici, la organele sensibile la acţiunea lor, unde exercită reglarea unor procese metabolice. Unii hormoni sunt molecule mici neproteice, astfel hormonii sexuali şi cei elaboraţi de cortexul suprarenalei sunt substanţe steroide. Hormonii pancreatici, hipofizari, paratiroidieni sunt de natură peptidică, compuşi dintr-un număr relativ mic de aminoacizi. Hormonii neurohipofizari sunt nonapeptide, insulina are 51 de resturi de aminoacizi, hormonul de creştere 191. Hormonii tiroidieni şi cei secretaţi de medulosuprarenală sunt derivaţi ai unor aminoacizi (7).

Toxine. O serie de substanţe extrem de toxice pentru animalele superioare chiar în cantităţi foarte mici, de natură proteică, includ *ricinul* din seminţele de ricin, *gossipina* din seminţele de bumbac, *toxina difteriei, toxina bacteriei aerobe Clostridium botulinum, veninurile şerpilor, albinelor, viespilor.*

Scanned with OKEN Scanner

Proteine bazice din nucleotide. *Protaminele* şi *histonele* se găsesc legate de acizii nucleici.

Protaminele au greutăţi moleculare mici şi cantităţi mari de arginină şi lizină, ceea ce le face să fie puternic bazice. Astfel, protamina din somon, *salmina,* are greutatea moleculară de 8 000 şi conţine 40 resturi de arginină, 7 de serină, 4 de prolină, 3 de glicocol, 2 de valină şi câte unul de izoleucină şi alanină.

Histonele sunt proteine relativ mici, foarte bazice, la pH = 7,0 sunt încărcate pozitiv şi au o masă moleculară de 10 000 – 20 000. Există cinci clase de histone, diferenţiate pe baza numărului relativ de lizină şi arginină (tabelul 11.2.) (3).

Tabelul 11.2.

Histonele aparţinând celor cinci clase

Clasa	aminoacidul cel mai frecvent, %	Masa moleculară
H_1	Lys 27	21 000
H_2A	Lys 16	13 000
H_2B	Lys 11 Arg 9	15 000
H_3	Arg 15 Lys 10	15 342
H_4	Arg 14 Gly 15	11 000

Unele grupări hidroxil ale serinei aflate în componenţa histonelor sunt fosforilate enzimatic de către *protein kinază*. Sarcinele pozitive ale histonelor, determină asocierea electrostatică a acestora cu grupările fosfat ale ADN, încărcate negativ, ceea ce conferă o mai mare flexibilitate moleculei de ADN.

11.7.2. PROTEINE INSOLUBILE

Proteinele insolubile sau scleroproteinele, numite adesea şi albuminoide, sunt de natură fibrilară, foarte rezistente la digestia cu enzime proteolitice, se găsesc în regnul animal şi sunt foarte răspândite, mai ales, la animalele superioare. În organism, au, în mod obişnuit, funcţii de susţinere şi

Scanned with OKEN Scanner

de protecţie. Conformaţia lor este mai simplă decât a proteinelor globulare, lanţurile lor polipeptidice sunt aranjate, de obicei, pe o singură dimensiune, adesea în mănunchiuri paralele.

Din această categorie de proteine, fac parte: *keratinele, colagenul, elastina, reticulina, fibroina, draglina* (*mătasea de păianjen*), *spongina* (din buretele de mare), *gorgonina* (din mărgean), *rezilina,* prezentă în articulaţia aripilor unor insecte etc.

Chimia, fizico-chimia, biochimia, biologia şi bioingineria acestor proteine insolubile şi, mai ales, despre colagen se va trata pe larg în partea a doua a acestei lucrări.

Keratinele sunt proteinele din epiderm, păr, lână, pene, unghii, copite, coarne. Acestea se disting printr-un conţinut mare de sulf, 3 % în păr şi lână, ceea ce corespunde cu 11 – 12 % cistină. Sunt insolubile în apă, în soluţii saline, sunt rezistente faţă de acizi, enzime şi mai puţin rezistente faţă de alcalii. Insolubilitatea keratinei se datorează unor legături transversale S – S între catenele sale polipeptidice.

Părul şi lâna se dizolvă uşor în soluţii apoase de sulfuri alcaline, care reduc grupele S – S la 2 S – H. Acidul tioglicolic şi cianurile alcaline au acţiune similară. Legătura S – S poate fi ruptă şi oxidativ cu apă oxigenată sau peracizi.

Fibroina, componenta fibroasă din mătasea naturală, se găseşte în acest material înconjurată de o componentă amorfă, *sericina*, care reprezintă 30 % din greutatea totală.

Colagenul este cea mai importantă şi cea mai abundentă proteină din organismul uman, el reprezintă componenta principală a ţesuturilor conjunctive.

Cea mai importantă funcţie a colagenului în organism este de a conferi rezistenţă şi de a păstra integritatea structurală a ţesuturilor în constituţia cărora intră. Colagenul este unicul constituent al organismelor superioare care prezintă rezistenţă la tracţiune. Colagenul este bogat în glicină, prolină şi hidroxiprolină, nu conţine cistină şi triptofan şi are în constituţie numai puţină metionină şi tirozină.

Macromolecula de colagen este formată din trei lanţuri polipeptidice sub formă de spirale cu răsucire de stânga, care, la rândul lor, se răsucesc împreună ca o elice de dreapta. Între cele trei catene şi între macromoleculele de colagen se stabilesc legături de hidrogen transversale.

Prin încălzire prelungită cu apă, colagenul poate suferi un proces de hidroliză, se produc ruperi de legături covalente şi se transformă în gelatină. Colagenul nativ este rezistent la acţiunea proteinazelor.

Scanned with OKEN Scanner

Gelatina este uşor atacată de pepsină şi tripsină. Gelatina, prin răcire, se transformă în gel elastic, în care conţinutul în substanţă uscată este de 2 – 3 %.

Elastina este proteina cea mai importantă din ţesutul conjunctiv al fibrelor elastice. Se găseşte în cantitate mare în aortă, artere, în unele tendoane. Ea se aseamănă prin majoritatea proprietăţilor (constituţie, solubilitate, unele funcţii) cu colagenul. Se deosebeşte prin faptul că nu prezintă inhibiţie, nu formează gelatină şi este hidrolizată de tripsină.

Elastina conţine un procent ridicat de glicină, leucină şi prolină şi nu conţine hidroxiprolină, alanină, aminoacizi dicarboxilici, triptofan şi histidină.

11.7.3. PROTEIDE

Proteidele sau *proteinele conjugate* sunt combinaţii între o proteină şi o componentă neproteică numită *grupă prostetică.* După natura grupei prostetice, se disting mai multe clase de proteide: *fosfoproteide, lipoproteide* (vezi cap 5), *glicoproteide* sau *mucoproteide* (vezi cap. 4), *cromoproteide, metalo-proteide, nucleoproteide.*

Fosfoproteide. Acidul fosforic, grupul prostetic al fosfoproteidelor esterifică grupările hidroxilice de la serină şi treonină ce intră în constituţia componentei proteice. Fosfoproteidele au caracter acid, acidul fosforic din structura lor, exprimat în fosfor, reprezentând doar 0,1 – 1,1 %. Sunt insolubile în apă şi soluţii acide, dar sunt solubile în soluţii alcaline, mai ales în soluţii de dicarbonaţi alcalini.

Fosfoproteidele de origine animală, cele mai importante, sunt *cazeina* din lapte şi *vitelina, vitelinina şi fosvitina* din gălbenuşul de ou.

Cazeina din laptele de vacă reprezintă 78 % din totalul proteinelor prezente. Alături de cazeină, în lapte, se mai găsesc 17 % α–lactalbumină, β–lactoglobulină, alte albumine şi globuline. Cazeina din lapte este insolubilă în soluţii acide şi, pe această cale, se separă de celelalte proteine care rămân în zer.

Cazeina nu este o substanţă unitară. Prin cromatografie şi electroforeză, s-au separat mai multe fracţiuni, dintre care patru sunt mai importante: α_{s1}–, α_{s2}–, β–, χ–. Greutăţile moleculare ale lor variază între 16 500 şi 27 000.

χ–Cazeina se deosebeşte de celelalte cazeine, prin faptul că este solubilă ca sare de calciu. Ea formează complecşi solubili cu celelalte cazeine. χ–Cazeina este o glicoproteidă, fiind singura cazeină care conţine zaharuri.

Cazeina conţine toţi aminoacizii esenţiali din punct de vedere alimentar, dar proporţia lor variază de la o specie animală la alta. În cazeină, şase

resturi de serină şi un rest de treonină sunt esterificate cu acid fosforic, care se prezintă sub formă de sare de calciu.

Vitelina, vitelinina şi *fosvitina* din gălbenuşul de ou sunt mult asemănătoare cazeinelor din lapte şi au acelaşi rol fiziologic de a furniza embrionului aminoacizii şi fosforul pentru dezvoltare.

Lipoproteidele sunt constituite din molecule mari, masa moleculară depăşind uneori 1 000 000. Ele au drept grup prostetic diferite lipide: colesterol, fosfolipide, gliceride, acizi graşi. Faptul că lipoproteidele sunt constituite din componente proteice solubile în apă şi componente lipidice hidrofobe face ca acestea să joace un rol important în permeabilitatea selectivă a membranelor. Lipoproteidele sunt mult răspândite în organism. Se găsesc în membranele celulare şi în elementele structurale ale celulelor. Lipoproteidele plasmatice sunt complexe în care lipidele şi proteinele se află într-un raport relativ fix. Ele transportă lipidele insolubile în apă în diferitele organe, pe cale sanguină, sub forma unor particule relativ mici (vezi cap. 5).

Glicoproteidele sunt compuşi de origine animală formaţi dintr-o proteină şi un hidrat de carbon (vezi cap. 4). Se numesc glicoproteide, proteidele care conţin mai puţin de 4 % polizaharidă şi mucoproteide cele care conţin mai mult de 4 % polizaharidă.

Dintre glicoproteide, fac parte albuminele din ou şi din ser, precum şi unele globuline din ser care conţin hidraţi de carbon.

În cartilagii, sunt prezente glicoproteide care conferă secreţiilor mucoase şi lichidului sinovial din articulaţiile vertebratelor, calitatea de lubrifiant.

Cromoproteidele au drept grupe prostetice substanţe colorate. Ele sunt variate prin constituţie şi îndeplinesc diferite roluri fiziologice în organism. Unele cromoproteide sunt considerate proteine respiratorii, deoarece au rolul de a transporta oxigenul în diverse organe; din această categorie, este *hemoglobina* care este transportor de oxigen în sângele vertebratelor.

Hemoglobina formează cu oxigenul molecular o combinaţie slabă, uşor disociabilă, *oxi-hemoglobina,* de culoare roşie şi se disociază în capilarele sanguine punând oxigenul în libertate, de unde difuzează în ţesuturi, servind la reacţiile de oxidare. La fel ca o moleculă de oxigen, dar mult mai strâns, se poate combina cu ferul din hemoglobină şi o moleculă de oxid de carbon. Acţiunea toxică a oxidului de carbon asupra organismului animal se datorează acestei blocări a grupei prostetice a hemoglobinei, care nu-şi mai poate îndeplini funcţia normală. *Carboxi-hemoglobina,* ca şi *oxi-hemoglobina,* este o combinaţie reversibilă şi trece în oxi-hemoglobină, când concentraţia parţială a oxigenului este mare.

Scanned with OKEN Scanner

Pigmenţii *vizuali* sunt cromoproteide, ca de exemplu, *rodopsina* din retină.

Mioglobina este o cromoproteidă din muşchi, asemănătoare hemoglobinei şi reprezintă o rezervă de oxigen disponibil pentru oxidările celulare. Mioglobina se găseşte în cantitate mai mare în muşchii care efectuează mişcări ritmice, cum sunt muşchii inimii, în muşchii pectorali ai păsărilor zburătoare.

O categorie de cromoproteide sunt enzimele: *catalaza, peroxidaza, citocromii, flavinenzimele,* care participă la reacţiile de oxido-reducere celulară.

Hemoglobinele din sângele vertebratelor şi al câtorva animale inferioare au aceeaşi grupă prostetică, *hemul*, şi se deosebesc prin componenta proteică, *globina.* Hemoglobina vertebratelor conţine patru molecule de hem, deci patru atomi de fer la mol. Hemul este o combinaţie complexă a ferului bivalent cu un colorant, *protoporfirina.*

Metaloproteidele sunt proteine conjugate, în care metalul este legat direct la proteină, printr-o legătură complexă, nu prin intermediul unei grupe prostetice organice.

Pigmenţii respiratori din sângele moluştelor şi al artropodelor, numiţi *hemocianine,* sunt proteide care conţin cupru. Hemocianinele sunt caracterizate prin mase moleculare foarte mari, între 500 000 şi 10 000 000 şi sunt dizolvate în masa sanguină. În stare neoxigenată, hemocianinele sunt incolore sau gălbui, iar în stare oxigenată, sunt albastre. La micşorarea presiunii parţiale de oxigen, oxi-hemocianinele elimină oxigenul absorbit.

Dintre metaloproteide, prezintă interes deosebit cele care au rolul de a transporta metale: *transferina* pentru fer, *ceruloplasmina* pentru cupru, sau de a depozita metale: *feritina* pentru fer. De asemenea, prezintă importanţă unele metaloproteide care sunt enzime: *ascorbatoxidaza* conţine Cu, *anhidraza carbonică* conţine Zn.

Nucleoproteidele au drept grupe prostetice acizi nucleici, care se unesc cu proteine simple din categoria protaminelor şi histonelor. Acestea se găsesc în toate celulele vii, inclusiv în bacterii şi viruşi; sunt componente esenţiale ale nucleelor, dar apar şi în plasma celulară, precum şi în multe sucuri şi secreţii ale organismului animal: lapte, fiere etc. Deosebit de bogate în nucleoproteide sunt: timusul, pancreasul, splina, ficatul, leucocitele, spermatozoizii.

Scanned with OKEN Scanner

11.8. SEPARAREA, PURIFICAREA ŞI CARACTERIZAREA PROTEINELOR

11.8.1. CONSIDERAŢII GENERALE

În vederea folosirii, orice produs chimic şi, mai ales, farmaceutic, natural sau obţinut pe cale de sinteză, este supus unor operaţii de purificare ce pot consta din:

a. operaţii primare de filtrare, centrifugare, sedimentare sau decantare;
b. separări prin extracţie cu solvenţi, adsorbţie, precipitare, ultrafiltrare;
c. purificare prin precipitare fracţionată, cromatografie şi cristalizare.

De obicei, sunt aplicate grupuri variate de operaţii de purificare.

Extracţia cu solvent, lichid – lichid este o tehnică importantă pentru obţinerea unui mare număr de produse naturale la fermentarea bulioanelor. Exemple de produse care sunt obţinute prin extracţia cu solvent sunt: etanolul, acidul lactic, acidul citric, penicilina G., cefalosporina, streptomicina, vitamina B, riboflavina. Solventul este, astfel, ales pentru a înlesni selectarea şi separarea cât mai bună a produsului în această fază.

Extracţia cu fluid supercritic. Fluidele, dincolo de temperatura şi presiunea lor critică, se numesc fluide supercritice. Dioxidul de carbon a fost, în cea mai mare măsură, utilizat ca fluid supercritic pentru extracţie în industria alimentară, dar şi în alte sectoare, cum ar fi cel farmaceutic. Costurile acestei tehnici împiedică, însă, extinderea aplicaţiilor sale.

Metode bazate pe membrane. Calea de alegere a membranelor este, în principal, criteriul prin care membranele separă moleculele. Pentru moleculele cu diametre în jur de 10Å–1.000Å, ultrafiltrarea poate fi folosită pentru concentrare şi separare. Membranele compozite produc cele mai bune reţineri. Selecţia membranelor are la bază, în primul rând, masa moleculelor ce urmează a fi separate.

Prevaporizarea constă într-o sorbţie selectivă a unui lichid într-o membrană, difuzia lichidului prin membrană şi conversia sa în fază de vapori pe cealaltă faţă a membranei produse prin aplicarea vacuumului. Este un proces intensiv de energie care poate separa lichidele. Selectivitatea, un înalt coeficient de difuzie şi rezistenţa mecanică sunt trei caracteristici ale acestor membrane.

Metodele cromatografice sunt indispensabile pentru izolarea produselor de înaltă puritate. Cromatografia de adsorbţie pe silicagel sau alumină (trioxid de aluminiu) s-a practicat de chimiştii organicieni de zeci de ani. Adsorbanţii sintetici neionogeni, ca răşinile de polistiren şi răşinile de meta-

Scanned with OKEN Scanner

crilaţi se folosesc, de asemenea, pentru variate aplicaţii. Cromatografia cu schimbători de ioni are aplicaţii multilaterale.

Practica curentă de purificare a proteinelor se poate divide în: metode cromatografice şi necromatografice. Metodele cromatografice au o înaltă rezoluţie şi sunt costisitoare. Tabelul 11.3. cuprinde diferitele metode de cromatografie existente în prezent. Metodele necromatografice (Tabelul 11.4.) nu sunt tot aşa de uşor de executat ca metodele cromatografice, sunt mai puţin precise şi se realizează la un cost mai scăzut.

În ultimul timp, s-au făcut eforturi de reducere a numărului de procese pentru purificarea proteinelor. Cele mai multe se bazează pe înalta selectivitate a afinităţii unor liganzi la legarea moleculelor proteice.

Tabelul 11.3.

Diferitele metode cromatografice utilizate

Cromatografia cu schimbători de ioni
Cromatografia pe bază de interacţiuni hidrofobe
Cromatografia cu hidroxiapatită
Cromatografia de afinitate cu metal imobilizat
Cromatografia cu interacţiune tiofilică
Cromatografia de inducţie cu încărcare hidrofobă
Cromatografia cu procedeu mixt de schimbători de ioni
Cromatografia de afinitate
Cromatografia de substituţie

Tabelul 11.4.

Metode necromatografice

Precipitarea la punctul izoelectric
Precipitarea cu săruri, polimeri, solvenţi organici, surfactanţi, ioni metalici
Separarea a două faze apoase
Trei faze de separare
Cristalizarea
Ultrafiltrarea

Scanned with OKEN Scanner

Cromatografia în strat expandat permite procesarea directă a suspensiilor brute. Aceasta utilizează un strat fluidizat, dar proprietăţile hidrodinamice ale mediului cromatografic sunt asemenea ca ale unui strat compact. Materialele suspendate trec prin spaţiile dintre particule, iar proteinele pot fi captate din mediu.

Cromatografia în strat expandat poate fi realizată pe calea cromatografiei cu schimbători de ioni, a cromatografiei cu interacţiune hidrofobă sau a cromatografiei de afinitate. Avantajele cromatografiei în strat expandat sunt: valoarea de tulburare, purificarea tehnică care se combină cu clarificarea şi concentrarea.

Cromatografia de afinitate a ionilor metalici imobilizaţi. Această metodă cromatografică foloseşte afinitatea ionilor metalici ca: Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} faţă de resturile de histidină, triptofan, fenilalanină, tirozină, prezente la suprafaţa proteinelor.

Poziţia acestor resturi şi alte proprietăţi ale suprafeţei proteinelor contribuie, de asemenea, la regimul de reţinere a proteinelor în coloana cromatografică. Ionul metalic este coordinat la ligandul chelatic (doi din cei mai folosiţi liganzi sunt acidul iminodiacetic şi acidul nitrolotriacetic), care este legat la un suport uzual (agaroza este cea mai folosită).

Afinitatea la precipitare. Această tehnică se bazează pe faptul că unii polimeri solubili în apă pot fi conjugaţi printr-o afinitate adecvată a ligandului. Complexul de afinitate format poate precipita din soluţie. Proteina poate fi recuperată din acest complex de afinitate, folosind cromatografia de afinitate.

Afinitatea ligandului facilitează trei faze de repartiţie. Trei faze de repartiţie este o altă tehnică de precipitare care exploatează sinergetic o sare şi un solvent organic la precipitarea proteinelor.

Adăugarea sulfatului de amoniu şi t-butanol la o proteină creează trei faze: o fază în partea superioară bogată în t-butanol, o fază apoasă inferioară şi un precipitat interfacial proteic. Precipitarea în trei faze a fost, în mare măsură, folosită pentru purificarea unui mare număr de proteine.

Separări pe bază de membrană. Îndepărtarea substanţelor cu moleculă mică din soluţiile proteice sau din suspensii prin dializă este cel mai obişnuit şi vechi exemplu de folosire a membranelor pentru purificarea proteinelor. Microfiltrarea efectuată la presiunea de 0,1 – 1,0 bari reţine particule cu mărimea de 0,1 – 10μm şi este folositoare, de exemplu, la îndepărtarea resturilor celulare din proba de proteină. Ultrafiltrarea la presiune ridicată, de 0,5 – 10 bari poate separa proteinele între ele.

Scanned with OKEN Scanner

11.8.2. SEPARAREA PROTEINELOR DIN AMESTECURI

Proteinele sunt macromolecule cu mase moleculare diferite, care formează soluții adevărate, sunt electroliți cu aceeași comportare, ca și electroliții mici. Pe baza proprietăților caracteristice proteinelor globulare în soluție, se poate proceda la separarea lor din amestecurile de proteine, în funcție de: masa lor moleculară, solubilitate, încărcarea electrică, diferențe în caracteristicile de adsorbție, afinitatea biologică față de alte molecule.

a) Separarea proteinelor bazată pe masa moleculară. Proteinele globulare din soluție pot fi separate de substanțele cu greutate moleculară mică prin *dializă*, utilizând o membrană semipermeabilă, care reține moleculele de proteină și lasă să treacă moleculele mici dizolvate și moleculele de apă. Un alt procedeu de separare a proteinelor de moleculele mici este *ultrafiltrarea* printr-o membrană semipermeabilă, sub acțiunea presiunii sau a forței centrifuge, pentru a separa, prin filtrare, moleculele mici dizolvate și moleculele de apă, de moleculele proteice.

Întrucât proteinele din soluție au tendința să sedimenteze în câmpuri centrifugale mari, se poate realiza separarea amestecurilor de proteine, aplicând *centrifugarea în gradient de densitate*, folosită la separarea și a altor tipuri de macromolecule, a organitelor celulare, a virusurilor. În procedeul obișnuit, se prepară mai multe soluții de zaharoză cu densități diferite, care se adaugă, într-o eprubetă de plastic de centrifugă, pe rând, în cantități egale, începând cu soluția de zaharoză care are densitatea cea mai mare și apoi se adaugă celelalte cu densități descrescânde. Amestecul de proteine, care trebuie separat, este depus în eprubetă deasupra soluției de zaharoză. Centrifugarea eprubetei, în poziție orizontală, într-un rotor la viteză mare, produce sedimentarea fiecărui tip de macromolecule, de-a lungul gradientului de densitate, în funcție de greutatea particulelor, dar și de densitatea și forma lor, dând naștere unor zone distincte. Se îngheață apoi eprubeta de plastic și se taie în felii subțiri pentru analiză (3).

O metodă eficientă de separare a macromoleculelor proteice în funcție de mărimea lor este *cromatografia de excludere moleculară*, numită și *cromatografia de „cernere moleculară"* sau *gel-filtrare*. După această metodă, amestecul de proteine dizolvat într-o soluție tampon adecvată este trecut, datorită forței de gravitație, printr-o coloană încărcată cu un polimer inert, puternic hidratat și spălat cu soluția tampon. Se folosește Sephadex (un derivat polizaharidic) sau Biogel (un derivat de poliacrilamidă) sau agaroză (un polizaharid). Moleculele de proteine cu mase moleculare mari nu pot pătrunde în porii particulelor de polimer și trec rapid prin coloană. Celelalte

Scanned with OKEN Scanner

molecule de proteine vor trece din ce în ce mai încet prin coloană, în funcție de mărimea lor moleculară. Se iau fracțiuni mici de eluent, li se determină concentrațiile proteice și se construiește o curbă de eluție.

b) Separarea proteinelor bazată pe diferența de solubilitate. Proteinele, în soluție, prezintă modificări în funcție de pH, tărie ionică, temperatură, proprietăți dielectrice ale solventului (3). Fiecare proteină are o compoziție specifică în aminoacizi, care determină comportarea sa ca electrolit. Și de aceea, factorii menționați mai sus pot fi folosiți la separarea proteinelor din amestecuri.

Proteinele au valori diferite de pH izoelectric datorită conținutului diferit în aminoacizi cu grupări R ionizabile și, de aceea, acestea pot fi adesea separate prin *precipitare izoelectrică*. pH-ul la care o proteină este cel mai puțin solubilă este *pH-ul izoelectric* (pH_i), când molecula nu are încărcare electrică și nu se deplasează într-un câmp electric. La pH_i, nu există respingere electrostatică între moleculele de proteină vecine. La valori de pH deasupra și sub punctul izoelectric, toate moleculele de proteină au o încărcare electrică de același semn și ele se resping, prevenind agregarea moleculelor și formarea de precipitate. Când un amestec de proteine, în soluție, este adus la pH_i al unei componente, cea mai mare parte sau toată componenta va precipita, lăsând în soluție proteinele cu valori ale pH_i deasupra sau sub acel pH. Proteina precipitată la pH_i își păstrează conformația nativă și poate fi redizolvată la pH-ul corespunzător. Valorile pH_i al proteinelor depind și de natura mediului în care sunt dizolvate. Astfel, pH_i, ca și aspectul curbei de titrare acido-bazice a unei proteine se pot modifica în prezența sărurilor neutre care influențează gradul de ionizare a diferitelor lor grupe laterale R.

Dacă o soluție de proteină este dializată intens față de apa distilată, pentru a se îndepărta toți ionii mici, în afară de H^+ și OH^-, soluția proteică va ajunge la un anumit pH care este pH-ul *izoionic*. pH-ul izoionic este o constantă pentru fiecare proteină.

c) Salifierea proteinelor. La concentrații mici, în săruri neutre, are loc creșterea solubilității proteinelor globulare. Sărurile divalente [$(NH_4)_2SO_4$, $MgCl_2$] sunt mult mai eficiente decât sărurile monovalente (NH_4Cl, NaCl, KCl). Capacitatea sărurilor neutre de a influența solubilitatea proteinelor este în funcție de *tăria ionică* (mărime care măsoară concentrația și numărul de sarcini electrice ale cationilor și anionilor formați de sare) (3).

Creșterea solubilității proteinelor la concentrații mici de sare neutră se datorează tendinței grupelor R disociabile ale proteinei de a ioniza. Odată cu creșterea tăriei ionice, solubilitatea proteinelor începe să scadă. La o anumită tărie ionică, o proteină poate să precipite aproape complet din soluție,

Scanned with OKEN Scanner

fenomen ce poartă numele de *salifiere*. Salifierea are loc, printre altele, datorită îndepărtării apei de hidratare din molecula de proteină, sub influența concentrației mari a sării neutre. Proteinele precipitate prin salifiere își păstrează conformația lor nativă și pot fi dizolvate din nou. Sulfatul de amoniu este preferat pentru salifierea proteinelor, deoarece este foarte solubil în apă, realizându-se o tărie ionică mare.

d) Fracționarea cu solvenți. Adăugarea de solvenți organici, miscibili cu apa, mai ales etanolul și acetona, scade solubilitatea în apă a proteinelor globulare, acestea precipitând din soluție. Atât etanolul, cât și acetona au constante dielectrice mult mai mici decât ale apei (de exemplu, la 20°C, apa = 80, etanolul = 24, acetona = 21), ceea ce face ca la adăugarea lor în soluția proteică apoasă, să crească forța de atracție dintre sarcinile de semn opus, scăzând astfel gradul de ionizare a grupelor R ale proteinei, iar moleculele de proteină au tendința de a se agrega și a precipita. Amestecurile de proteine pot fi separate pe baza diferenței cantitative a solubilității lor în amestecuri reci de etanol–apă sau acetonă-apă (3).

e) Influența temperaturii asupra solubilității proteinelor. La majoritatea proteinelor globulare, cu creșterea temperaturii între 0° și 40°C, solubilitatea lor se mărește. Peste 40° – 60°C, cele mai multe proteine încep să se denatureze, ceea ce duce la scăderea solubilității lor la pH neutru. De aceea, procedeele de separare a proteinelor din amestecuri trebuie să aibă loc la temperaturi scăzute, oricum sub 40°C.

f) Separarea proteinelor bazată pe încărcarea lor electrică se bazează pe proprietățile lor acido-bazice, care sunt determinate de tipul și numărul grupelor laterale ionizabile R ale lanțurilor polipeptidice. Fiecare proteină are proprietăți acido-bazice distincte, deoarece fiecare are componențe și secvențe de aminoacizi diferite. Pentru separarea și analiza amestecurilor de proteine, având la bază proprietățile lor acido-bazice caracteristice, se utilizează electroforeza și cromatografia de schimb ionic în diferite variante.

g) Separarea proteinelor prin adsorbție selectivă. Proteinele pot fi adsorbite și eluate în coloane cu materiale relativ inerte, foarte fin divizate. Se utilizează substanțe nepolare (cărbunele) și substanțe polare (silicagelul, gelul de aluminiu) (3). Adsorbantul mult folosit pentru purificarea proteinelor este *hidroxiapatita* (fosfat de calciu cristalin), același mineral ce se găsește în oase. Grupele electronegative din moleculele de proteină se leagă de ionii de calciu ai rețelei cristaline ai hidroapatitei. Proteinele pot fi eluate de pe coloanele de hidroapatită cu tampoane fosfat.

Scanned with OKEN Scanner

11.8.3. EXTRACŢIA ŞI PURIFICAREA PROTEINELOR

Extracţia şi purificarea proteinelor este o problemă complexă, având în vedere numărul mare de proteine, varietatea acţiunilor lor biologice şi deosebirile chimice dintre proteinele omoloage din diferitele organisme. De aceea, pentru fiecare proteină, se alege o secvenţă de mai multe etape de separare, care să ducă la un grad cât mai înalt de purificare sau la creşterea activităţii biologice pe unitatea de greutate şi la un randament cât mai mare.

Dintre procedeele de separare utilizate în etapele iniţiale, pot fi evidenţiate: precipitarea izoelectrică, fracţionarea prin salifiere, precipitarea cu solvenţi. Etapele premergătoare nu au putere mare de rezoluţie şi sunt urmate frecvent de procedee cromatografice.

11.8.4. CARACTERIZAREA MOLECULELOR DE PROTEINE

Proteinei separate şi purificate trebuie să i se determine gradul de omogenitate. Pentru acest scop, se utilizează cromatografia de excludere moleculară, electroforeza pe gel de poliacrilamidă, focusarea izoelectrică, metode care au un grad ridicat de rezoluţie şi pot detecta cu uşurinţă prezenţa unor cantităţi mici de impurităţi (3).

După stabilirea gradului de omogenitate a proteinei, aceasta poate fi caracterizată prin determinarea masei moleculare, dacă este formată din unul sau mai multe lanţuri polipeptidice, masa moleculară a fiecărui lanţ, compoziţia în aminoacizi a lanţurilor polipeptidice, secvenţa aminoacizilor în lanţurile polipeptidice.

Bibliografie selectivă:

1. Chiriţă, Gh., Chiriţă, M., *Chimia Pielii*, ed. a II-a, Editura IPI, Iaşi, 1987.
2. Chiriţă, M., *Biopolimeri şi Compozite Naturale*, Editura Tehnică-Info, Chişinău, 2001.
3. Dickerson, R.E., Geis, I., *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstrasse, 1971.
4. Nenițescu, C.D., *Chimie Organică*, Vol. I şi II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
5. Lehninger, A.L., *Biochimie*, Vol. I şi II, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, 1992.

Scanned with OKEN Scanner

Compuşii organici biosintetizaţi de lumea vie, incluzând biopolimeri ca acizii nucleici, polizaharidele şi proteinele, metaboliţii primari şi secundari, produşii micromoleculari şi apa constitule biomolecule.

Stricto senso, apa nu este o biomoleculă, însă constituie solventul vieţii, fără de care biomoleculele nu ar putea exista, fiind esenţială pentru toate interacţiunile delicate care fac viaţa posibilă.

Proteinele, cărora prezentul tratat le dedică întreg volumul al II-lea, sunt componente esenţiale, alături de apă, săruri anorganice, lipide, hidraţi de carbon, acizi nucleici, vitamine, enzime etc. ale materialelor lichide şi gelificate din celule, în care au loc interacţiuni fizico-chimice intense, cuprinse sub denumirea de *viaţă*.

Materialele biologice probează performanţe specifice şi caracteristici remarcabile, dobândite nu prin utilizarea unor materiale performante, ci prin specificul construcţiei şi al design-ului structurilor. Lumea biologică este conservatoare sub aspectul componentelor utilizate, dar extrem de subtilă în abilitatea de aranjare structurală a acestora.

Biomimetica (biomimeză, biognoză, bionică) reprezintă beneficiul tehnologic obţinut prin actul de a împrumuta sau de a fura idei de la natură, iar studiile biomimetice au menirea de a clarifica de ce performanţele materialelor naturale sunt semnificativ superioare acelora făcute de mâna omului (compozitele sintetice) sau care dintre componentele naturale sunt responsabile de anumite proprietăţi sau caracteristici.

Compoziţia chimică, reactivitatea componentelor *in vivo*, forma, dimensiunile, orientările angulare şi organizarea pe ansamblu a materialelor biocompozite pot sugera noi concepte de materiale sintetice sau hibrid, natural-sintetice.

editura sed com libris
CARTEA ESTE O PASIUNE, IAR PASIUNEA SE ÎMPARTE...
acreditare C.N.C.S.I.S
editare, traducere, tipărire,
propunere de publicare în străinătate,
promovare şi difuzare în întreaga ţară
PENTRU CĂ NE PASĂ CINE EŞTI, CE FACI, CUM FACI ŞI UNDE VREI SĂ AJUNGI...

I.S.B.N.: 978-973-670-321-8
I.S.B.N. (vol. 1) 978-973-670-322-5
9 789736 703218

Scanned with OKEN Scanner